



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Evaluación in vitro del efecto inmunomodulador del
extracto metanólico del ecotipo morado de *Lepidium
meyenii*, Walpers sobre la expresión génica y secreción
de TNF- α por células mononucleares de sangre
periférica humana**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo**

AUTOR

Julio Kevin HUAYHUA RODRIGUEZ

ASESOR

Libertad ALZAMORA GONZALES

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Huayhua J. Evaluación in vitro del efecto inmunomodulador del extracto metanólico del ecotipo morado de *Lepidium meyenii*, Walpers sobre la expresión génica y secreción de TNF- α por células mononucleares de sangre periférica humana [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología; 2018.



Universidad Nacional Mayor De San Marcos

(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)


Siendo las 17:05 horas del 06 de diciembre de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **JULIO KEVIN HUAYHUA RODRIGUEZ**.


Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 017-EPGB-2018, el titulando expuso su tesis: **"EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DEL EXTRACTO METANÓLICO DEL ECOTIPO MORADO DE *Lepidium meyenii*, Walpers SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y SECRECIÓN DE TNF- α POR CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19....., calificativo: Aprobado con maximos honores

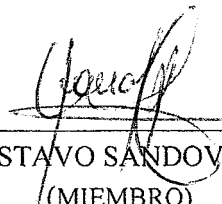
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **JULIO KEVIN HUAYHUA RODRIGUEZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

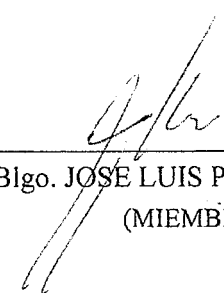
Siendo las 18:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 06 de diciembre de 2018.


Dra. FANNY LAZO MANRIQUE
(PRESIDENTA)


Dra. LIBERTAD ALZAMORA GONZALES
(ASESORA)


Mg. GUSTAVO SANDOVAL PEÑA
(MIEMBRO)


Blgo. JOSÉ LUIS PINO GAVIÑO
(MIEMBRO)

Esta investigación fue financiada por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a través de la segunda convocatoria del Programa de Promoción de Tesis de Pregrado y Posgrado 2017 (proyecto código: B17100224b), con fondos del proyecto PCONFIGI 2017 (código: B17100016b) y proyecto CONCON 2016 (código: 160104041).

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por quien estamos aquí presentes, por darme la fuerza necesaria para poder hacer frente al sinnúmero de adversidades que se me presentaron. Gracias a Dios por tanta bendición.

A mis padres, Julio y Marleny, por el extraordinario soporte que me han brindado durante todos estos años, sin el cual, mi paradero y futuro sería incierto. Gracias por enseñarme a luchar siempre, pase lo que pase.

A mi abuelo Alberto, quien hizo las veces de padre cuando fue necesario. Aunque ya no estés con nosotros, cada logro que pueda alcanzar será siempre dedicado a ti.

A Mateo, mi primogénito, por haber llegado en un momento preciso de mi vida y darle un espectacular giro, que es el que hasta el día de hoy me sigue impulsando y llenando de vida.

A Doménica, mi princesa, por llenarme de una inmensa alegría desde tu llegada y ser una motivación constante que me impulsa a ser mejor persona.

A Lucero, mi compañera de vida, por darme dos hijos maravillosos, por su infinito apoyo en la redacción de este trabajo, por ser mi apoyo emocional, mi amiga, consejera y confidente. Te amo muchísimo.

A mi asesora y maestra, la Dra. Libertad, por haber confiado en mí desde un principio incluso sin merecerlo, por los valiosos consejos personales, académicos y profesionales. Por el apoyo constante, paciencia y comprensión en la realización del presente trabajo, gracias infinitas.

A mi maestro y amigo, Mg Erasmo Colona, por haberme dado la oportunidad de integrarme al excelente equipo de trabajo de Inmunología. Por hacer de nuestro laboratorio un ambiente grato de trabajo, sazonado por su buen sentido del humor y por las innumerables veces que me brindó su asesoría y apoyo.

A los revisores y miembros del jurado de la presente tesis, por cada consejo que contribuyó a enriquecer la investigación.

A mis colegas Emely, Luis, Mónica y Ricardo, por haber sido parte del equipo de Inmunología el cual tuve el honor de integrar.

A los ayudantes del laboratorio por haber facilitado el trabajo del laboratorio y las prácticas, y por ser quienes actualmente llevan la posta del grupo.

A cada uno de mis compañeros de la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, base 2012, con quienes compartí cinco maravillosos años de mi vida, llenos de momentos de alegría, diversión y compañerismo.

A la Blga. Rosmary López y las empresas Reprogenetics Latinoamérica, ADN Diagnóstico y Concebir, por haberme dado las facilidades para poder culminar la tesis.

Al Prof. José Olivera, por habernos apoyado con la obtención de los hipocótilos de maca morada.

Al Prof. Jorge Chávez de la UNALM, por su contribución en las pruebas fitoquímicas.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, que representa a toda nuestra nación, por haberme alojado durante todos estos años, compartiéndome su histórico legado. Por haberse convertido en mi alma máter, por quien tengo la difícil tarea de superarme día a día para dejar en alto a la institución.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Sistema y respuesta inmune	4
2.1.1 Inmunidad innata.....	6
2.1.2 Mecanismos celulares efectores de la inmunidad innata.....	10
2.1.2.1 Especies reactivas de oxígeno (EROs).....	10
2.1.2.2 Especies reactivas de nitrógeno.....	12
2.1.3 Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).....	14
2.2 Inmunomoduladores.....	16
2.3 <i>Lepidium meyenii</i> Walpers: MACA.....	18
2.3.1 Descripción botánica y cultivo.....	20
2.3.2 Valor nutricional y composición fitoquímica.....	21
2.3.3 Actividad biológica y terapéutica de <i>Lepidium meyenii</i>	24
2.3.4 Potencial inmunomodulador de <i>Lepidium meyenii</i>	24
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	31
4.1 Material Biológico.....	31
4.1.1 Ejemplares de <i>Lepidium meyenii</i> , Walpers ecotipo morado.....	31
4.1.2 Muestra de sangre periférica humana.....	31
4.2 Preparación de harina de <i>L. meyenii</i>	32

4.3 Obtención del extracto metanólico de <i>Lepidium meyenii</i> , Walpers ecotipo morado.....	32
4.4 Determinación de la composición fitoquímica y capacidad antioxidante.....	35
4.5 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana.....	36
4.6 Preparación de la solución stock de EM.....	38
4.7 Evaluación de la viabilidad celular de PBMC cultivados con EM.....	38
4.8 Evaluación de la actividad inmunomoduladora del EM de <i>L. meyenii</i> sobre PBMC.....	39
4.8.1 Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno.....	39
4.8.2 Determinación de la producción de especies reactivas de nitrógeno	40
4.9 Evaluación del efecto del EM de <i>L. meyenii</i> sobre la producción de TNF- α	41
4.9.1 Cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana.....	41
4.9.2 Determinación de la expresión de mRNA de TNF- α	42
4.9.2.1 Extracción de RNA total.....	42
4.9.2.2 Síntesis de cDNA (RT-PCR).....	44
4.9.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional.....	45
4.9.2.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	46
4.9.2.5 Análisis por cuantificación densiométrica.....	47
4.9.3 Determinación de TNF- α secretado por PBMC.....	47
4.10 Análisis estadístico.....	50
V. RESULTADOS.....	51
5.1 Obtención de extracto metanólico de <i>Lepidium meyenii</i> (ecotipo morado).....	51
5.2 Determinación de la composición fitoquímica y capacidad antioxidante.....	51
5.3 Evaluación de la viabilidad de PBMC cultivadas con EM.....	52

5.4 Evaluación de la actividad inmunomoduladora del EM de <i>L. meyerii</i> sobre PBMC.....	53
5.4.1 Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno.....	53
5.4.2 Determinación de la producción de óxido nítrico (NO) por PBMC.....	55
5.5 Evaluación de la producción de TNF- α	57
5.5.1 Cultivo de PBMC.....	57
5.5.2 Determinación de la expresión génica de la citoquina TNF- α	58
5.5.3 Determinación de TNF- α secretado por PBMC.....	60
 VI. DISCUSIÓN.....	 62
 VII. CONCLUSIONES.....	 73
 VIII. RECOMENDACIONES.....	 74
 IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 75
 ANEXOS.....	 88

i. ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de varianza

CD: *Cluster of differentiation*

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CN: Control negativo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNAg: Ácido desoxirribonucleico genómico

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

DPPH: *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*

EDTA: Ácido Etilén Diamino Tetra Acético

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EM: Extracto metanólico

EM5: Extracto metanólico a 5µg/mL

EM25: Extracto metanólico a 25µg/mL

EM50: Extracto metanólico a 50µg/mL

EM100: Extracto metanólico a 100µg/mL

EM200: Extracto metanólico a 200µg/mL

EM400: Extracto metanólico a 400µg/mL

EM800: Extracto metanólico a 800µg/mL

EROs: Especies reactivas de oxígeno

FT: Factor de transcripción

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HeLa: Línea celular de Henrietta Lacks

HIV: Virus de inmunodeficiencia humana

HRP: *horseradish peroxidase*

HT-29: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal

IFN- γ : Interferón gamma

IL: Interleucina

IMC: Índice de masa corporal

LB: Linfocito B

LPS: Lipopolisacárido

LSM®: *Lymphocyte separation medium*

LT: Linfocito T

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MTT: Metil tiazol tetrazolio

NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina

NADPH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato

NED: Naftiletilendiamina

NBT: *Nitroblue tetrazolium*

NF- κ B: Factor de transcripción nuclear kappa

NK: *Natural Killer*

NKT: Célula T *Natural Killer*

NMR: Resonancia magnética nuclear

NO: *Nitric oxide* u óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógeno

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica humana

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: *Polymerase chain reaction* o Reacción en cadena de la polimerasa

PHA: Fitohemaglutinina

PMA: *Phorbol myristate acetate*

PRR: *Pattern Recognition Receptor* o receptor de reconocimiento de patrones.

QP: Químicamente puro

RNA: Ácido ribonucleico

RPM: Revoluciones por minuto

RPMI-1640: Medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* 1640

SOD: Superóxido dismutasa

STAT: *Signal transducer and activator of transcription protein family*

STF: Suero de ternera fetal

TA: Temperatura ambiente

TBE: Tris, borato y EDTA

Th1: Linfocitos T *helper* 1

TIR: *Toll/interleukin-1 receptor*

TLR: *Toll-like receptor*

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

UV: Ultravioleta

ii. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Lepidium meyenii</i> Walpers.....	19
Tabla 2. Efectos biológicos y terapéuticos de <i>Lepidium meyenii</i> Walpers sobre diferentes especies.....	26
Tabla 3. Preparación de mix de reacción para síntesis de cDNA.....	44
Tabla 4. Programa en termociclador para la síntesis de cDNA.....	44
Tabla 5. Programa en termociclador para PCR convencional.....	45
Tabla 6. Resultados de análisis fitoquímico realizado.....	51
Tabla 7. Prueba de viabilidad por el método de MTT en células mononucleares de sangre periférica humana.....	52
Tabla 8. Resultados obtenidos de la evaluación de la producción de EROs (explosión respiratoria) por PBMC.....	54
Tabla 9. Determinación de la producción de NO por PBMC a través de la prueba de Peter Griess.....	56
Tabla 10. Prueba de ELISA para cuantificación de TNF- α secretado por PBMC...	61

iii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos inmunitarios naturales y adaptativos.....	5
Figura 2. Electromicrografía de un macrófago (morado) atacando bacterias <i>E. coli</i> ...	7
Figura 3. Receptores tipo Toll y las vías de señalización involucradas.....	9
Figura 4. Generación de moléculas microbidas por la maquinaria enzimática de un fagocito.....	11
Figura 5. Algunas de las potentes reacciones del NO.....	14
Figura 6. Reacción de Peter Griess.....	14
Figura 7. Ejemplares de <i>Lepidium meyenii</i> Walpers.....	19
Figura 8. Estructura de <i>Lepidium meyenii</i>	21
Figura 9. Ejemplares de <i>L. meyenii</i> (ecotipo morado) colectados en el departamento de Junín.....	31
Figura 10. Preparación de harina de hipocótilo de <i>L. meyenii</i> (ecotipo morado).....	32
Figura 11. Proceso de elaboración de extracto metanólico de “maca morada”.....	33
Figura 12. Flujograma para la elaboración de extracto metanólico de maca morada..	34
Figura 13. Proceso de aislamiento de PBMC.....	37
Figura 14. Preparación de solución stock de EM.....	38
Figura 15. Distribución de tratamientos en microplaca de 96 pocillos para prueba de viabilidad por MTT.....	39
Figura 16. Cultivo celular para prueba de anión superóxido.....	40
Figura 17. Cultivo celular para extracción de RNA y evaluación de TNF- α	41
Figura 18. Extracción de RNA.....	42
Figura 19. Flujograma para la extracción de RNA total.....	43
Figura 20. RT-PCR.....	45
Figura 21. Análisis de expresión génica por PCR convencional.....	46
Figura 22. Cuantificación densiométrica.....	47
Figura 23. ELISA para identificación de TNF- α secretado por PBMC.....	48

Figura 24. Flujograma de ELISA para identificación de TNF- α secretado por PBMC..	49
Figura 25. Ensayo de viabilidad por MTT en PBMC.....	52
Figura 26. Ensayo de viabilidad de PBMC en presencia de extracto metanólico de maca morada.....	53
Figura 27. Evaluación de producción de EROs por PBMC.....	54
Figura 28. Evaluación de la producción de EROs (explosión respiratoria) por PBMC.	55
Figura 29. Ensayo de Peter Griess para la determinación de NO.....	56
Figura 30. Cultivo de PBMC.....	57
Figura 31. Expresión génica de la citoquina proinflamatoria TNF- α por PBMC a 18 h de cultivo.....	59
Figura 32. Prueba de ELISA para detección de TNF- α secretado por PBMC.....	60
Figura 33. Secreción de TNF- α por células mononucleares de sangre periférica humana.....	61
Figura 34. Mecanismos hipotéticos de activación de PBMC.....	72

RESUMEN

Lepidium meyenii, Walpers, conocido mundialmente como “maca”, es un tubérculo nativo de los Andes del Perú, que vive en regiones a más de 4000 msnm. Es reconocida mundialmente y ha sido objeto de numerosos estudios por muchas propiedades terapéuticas, afrosídiacas, entre otras que se le atribuyen; siendo alguna de estas ya verificadas científicamente. Su participación como inmunomodulador también ha sido estudiada, llegándose a encontrar efectos protectores, anticancerígenos; sin embargo, aún existe controversia sobre su participación en procesos inflamatorios. Es por eso que el objetivo de la presente investigación fue verificar su efecto sobre la producción de mRNA y secreción de TNF- α , una citoquina clave en los procesos inflamatorios, además de otros intermediarios como óxido nítrico (NO) y anión superóxido en células mononucleares de sangre periférica humana. Para esto se preparó un extracto metanólico (EM), partiendo de harina de hipocótilo deshidratado del ecotipo morado de maca. Se realizaron pruebas de viabilidad, a través de la reducción del MTT. El óxido nítrico fue medido utilizando la reacción de Peter Griess, mientras que el “estallido respiratorio” fue cuantificado a partir de la reducción del nitroblue tetrazolio (NBT). La expresión génica y secreción de TNF- α fueron evaluadas por un análisis cuali-cuantitativo a partir de PCR convencional, y ELISA tipo sándwich, respectivamente. Los resultados mostraron que el EM no afectó la viabilidad celular, ni estimuló significativamente la producción del anión superóxido. Sin embargo, se demostró un aumento dosis-dependiente de la producción de NO y TNF- α . Los hallazgos sugieren que los metabolitos secundarios que contiene el EM estimulan la respuesta inmune innata celular, siendo necesarias futuras investigaciones que complementen estos hallazgos.

Palabras clave: *Lepidium meyenii*, ecotipo morado, TNF- α , óxido nítrico, inmunomodulación.

ABSTRACT

Lepidium meyenii, Walpers, known worldwide as "maca", is a tuber native of the Peruvian Andes that grow in regions more than 4000 meters above sea level. It is recognized worldwide and has been the object of numerous studies to find many therapeutic properties, as aphrodisiac, among others that are attributed to it; being one of these already scientifically verified. Its participation as an immunomodulator has also been studied, reaching to find protective effects, anticancer properties; however, there is still controversy about their participation in inflammatory processes. That is why the objective of the present investigation was to verify its effect on TNF- α mRNA production and secretion, a key cytokine in inflammatory processes, in addition to other intermediates such as nitric oxide (NO) and superoxide anion in human peripheral blood mononuclear cells. For this, a methanolic extract (EM) was prepared, starting from dehydrated hypocotyl flour of the purple ecotype of maca. Viability tests were carried out, through the reduction of MTT. Nitric oxide (NO) was measured using the Peter Griess reaction, while the "respiratory burst" was quantified from the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT). Gene expression and secretion of TNF- α were evaluated by a qualitative-quantitative analysis from conventional PCR, and sandwich ELISA, respectively. The results showed that methanolic extract did not affect cell viability and not significantly stimulation of superoxide anion production was observed. However, a dose-dependent increase in the production of NO and TNF- α was demonstrated. The findings suggest that the secondary metabolites contained in the methanolic extract stimulate the cellular innate immune response, and future research is necessary to complement these findings.

Keywords: *Lepidium meyenii*, purple ecotype, TNF- α , nitric oxide, immunomodulation.

I. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune de cualquier individuo es el responsable de mantenerlo salvaguardado ante cualquier agente externo o interno que pueda dañarlo, pues en presencia de un antígeno se activan una serie de mecanismos celulares y moleculares que funcionan de manera sincronizada, armónica y regulada, tanto de la inmunidad innata como adquirida.

Existen situaciones en las que el sistema inmune se ve afectado o comprometido, y por ende, el organismo se muestra vulnerable a infecciones que en situaciones normales serían rápidamente neutralizadas. Se han descrito múltiples tipos de hospederos inmunocomprometidos (inmunodeprimidos) y una gran variedad de microorganismos que se relacionan específicamente con cada uno de los defectos inmunitarios. Por ejemplo, individuos neutropénicos son más susceptibles a microorganismos como bacilos gramnegativos aerobios (enterobacterias), cocos grampositivos aerobios o anaerobios y hongos levaduriformes o filamentosos como *Candida albicans* o *Aspergillus sp.*, respectivamente (Cuéllar, 2013), pudiendo incluso llevarlos a la muerte. Las causas que llevan a estos cuadros son diversas y van desde infecciones, intoxicación por fármacos, tratamiento con quimioterapias, radioterapias e incluso pacientes onco-hematológicos.

Existen productos que tienen la capacidad de modular la respuesta inmune ya sea potenciando o suprimiéndola. Estos productos se conocen como inmunomoduladores (Takx-Köhlen, 1992), y producen un efecto biológico o farmacológico sobre los mecanismos moleculares y celulares que gobiernan el equilibrio de la respuesta inmune innata y/o adaptativa. Estos pueden actuar de forma específica o inespecífica, dependiendo si la acción va dirigida a un antígeno determinado o no (Martínez, 2006). Las plantas, como *Lepidium meyerii*, y sus metabolitos son una fuente importante de estas moléculas y se han usado como productos medicinales desde tiempos inmemorables (Atal et al., 1986; Sifuentes-Penagos et al., 2015). Diversos autores han atribuido estas propiedades a determinados metabolitos secundarios, tales como

flavonoides, tocoferoles, polifenoles, saponinas, cumarina, esteroides, entre otros (Fulzele et al., 2003; Nagarathna et al., 2013). Sin embargo, no se conoce con certeza el mecanismo de acción en las rutas metabólicas susceptibles a estos productos (Luengo, 2008).

Newman y Cragg (2012) hicieron un informe acerca de las entidades químicas de origen natural encontradas desde 1981 hasta 2010, que pueden ser fuentes de nuevas drogas, anotando un total de 28 frente a 44 entidades químicas sintéticas. En la actualidad los tratamientos médicos comunes utilizan fármacos que producen efectos secundarios o incluso generan resistencia en determinado grupo de organismos infecciosos, por lo cual en la búsqueda de nuevos medicamentos se recurre a la naturaleza.

El Perú es uno de los doce países megadiversos, albergando alrededor de 25 000 sp. de plantas (Mittermeier et al., 2003; Brack, 2004); además posee un conocimiento etnobotánico ancestral sobre el uso de plantas con fines medicinales, que aún no ha sido validado científicamente en su totalidad (Luengo, 2008). Estas especies son un blanco de búsqueda de nuevos principios activos con diversas actividades, entre ellas, modular la función del sistema inmune. Siendo *L. meyenii* considerada una especie andina con múltiples propiedades biológicas, farmacológicas y terapéuticas (Alzamora, 2003; Gonzales et al., 2014; Sifuentes-Penagos, 2015), usada por nuestros ancestros, aún no se ha descrito completamente su potencial inmunomodulador.

El proceso inflamatorio es clave en una respuesta inmunitaria; hay evidencia de productos de *L. meyenii* con efectos proinflamatorios (Alzamora et al., 2007d; Wang et al., 2016; Zhang et al., 2016). Gonzales et al. (2014) encontraron actividad antiinflamatoria del ecotipo rojo de *L. meyenii* sobre tejido prostático. Gasco (2014) reporta un descenso en los niveles de TNF- α en tejidos hiperplásicos inducidos de ratones, al ser dosificados con el ecotipo rojo de *L. meyenii*. Otras brasicáceas muestran actividad antiinflamatoria (Tsai, 2010).

Teniendo a estas fuentes inmunomoduladoras debidamente caracterizadas, se podrían proponer tratamientos complementarios que coadyuven a estimular la inmunidad en situaciones de inmunosupresión (por ejemplo en quimioterapias), o incluso regularla en caso de un proceso inflamatorio exacerbado.

Por lo tanto, en base a la importancia de TNF- α en la inmunidad celular, mediante el presente estudio se busca verificar la producción de mRNA para esta citoquina, así como su secreción por células mononucleares, que permitirá dilucidar su participación en los procesos inflamatorios y proponer su consumo limitado en individuos con enfermedades o procesos con hiperfunción inmunológica.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Sistema y respuesta inmune

El sistema inmune de todo organismo es el conjunto de biomoléculas, células, tejidos y órganos que funcionan de manera sincronizada, armónica y regulada, y responde ante cualquier agente externo o interno (antígeno) que pueda dañarlo, a través de la activación de una serie de mecanismos celulares y moleculares. Esta respuesta ha evolucionado paralelamente con la evolución biológica, pues desde los organismos simples se pueden evidenciar diversas estrategias para reconocer, neutralizar y/o eliminar elementos extraños que podrían perjudicar su integridad. Muchas de estas estrategias guardan algunos principios fundamentales como la capacidad de reconocer lo propio y diferenciarlo de lo extraño, activación de “cascadas proteolíticas” (como la cascada del complemento y el sistema de la fenoloxidasa en vertebrados e invertebrados, respectivamente) o la presencia de algunas moléculas afines a proteínas, lípidos y carbohidratos de patógenos. Los vertebrados llegaron a desarrollar moléculas con enorme especificidad, como los anticuerpos (Gutiérrez, 2009; Lanz & Hernández, 2015).

De acuerdo a su complejidad la respuesta inmune se divide clásicamente en innata y adaptativa. En la inmunidad innata, los mecanismos que la conforman están previamente instaurados antes de la exposición al inmunógeno, por ende, evitan la infección o la respuesta suele ser rápida una vez que se llega a producir (Collado et al., 2008). Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa se inicia tras la exposición a un antígeno determinado y se potencia en cada nueva exposición, además, está dotada de una impresionante especificidad a un sinnúmero de epítopes y posee la capacidad de “recordar” las exposiciones previas. Esto permite que ante las sucesivas reinfecciones, la respuesta sea más específica y rápida. Las células más destacadas que dan origen a las respuestas adaptativas son los linfocitos, y sus productos de secreción como los anticuerpos adquieren un papel central por la variabilidad (y especificidad) que poseen

y por los diversos procesos en los que participan. Ambos tipos de respuesta inmune están integrados (Figura 1), pues es conocido que varias citoquinas producidas por fagocitos estimulan la respuesta inmune adaptativa, y los productos de ésta última potencian los mecanismos de las respuestas innatas (como la quimiotaxis y fagocitosis), tal como se demostró desde inicios del siglo pasado, al reportarse que componentes humorales como los anticuerpos (producto de la inmunidad adaptativa) opsonizan patógenos y facilitan la fagocitosis (Wright et al., 1903).

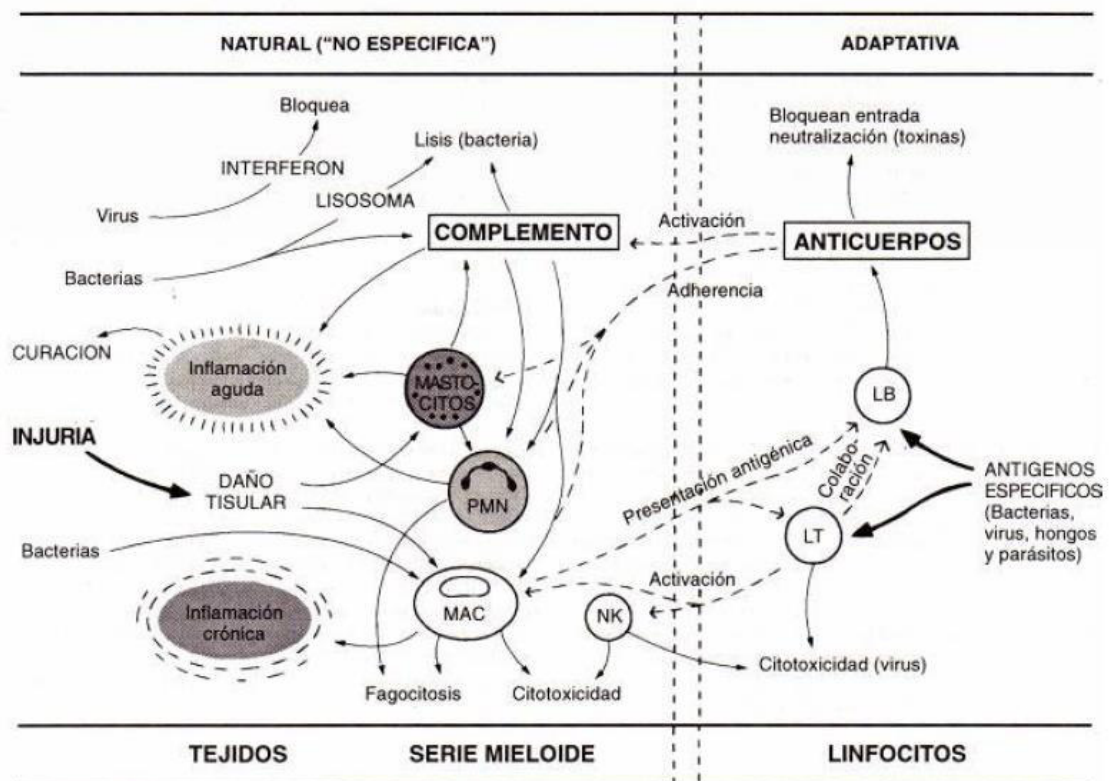


Figura 1. Mecanismos de inmunidad innata y adaptativa. Se puede observar una cooperación entre los mecanismos de ambos tipos de inmunidad. Mientras la respuesta innata es rápida, la adaptativa humoral toma algún tiempo en producir unas moléculas efectoras muy específicas denominadas anticuerpos. Los fagocitos destruyen a los microbios y realizan la presentación a los linfocitos. A su vez, algunos mecanismos de los linfocitos potencian las respuestas inmunes innatas. MAC: Macrófago; PMN: Leucocito polimorfonuclear; LB y LT: Linfocitos B y T; NK: Célula *natural killer* (Playfair, Inmunología en esquemas, 6ª Ed, 1997)

2.1.1 Inmunidad innata

Desde un enfoque evolutivo, la inmunidad innata precede a la adaptativa y predomina en muchos organismos. Los vertebrados han logrado desarrollar una respuesta más específica, y en estos grupos animales, la inmunidad innata requiere la participación de fagocitos, como los macrófagos, que presentan los antígenos a los LTCD4+, vía MHC de clase II, además de producir citoquinas esenciales como IL-1, IL-12 o TNF- α , sin las cuales la respuesta inmune adaptativa sería inefectiva (Beutler, 2004).

La inmunidad innata de tipo celular depende en gran medida de la línea mieloide, que incluye a los fagocitos mononucleares y polimorfonucleares. Los fagocitos mononucleares abarcan a los macrófagos (Figura 2), derivados de monocitos sanguíneos, los mismos que componen una población celular heterogénea. Estos macrófagos pueden ser morfológicamente diversos, adoptando formas estrelladas, de huso, alargadas, y pueden recibir diversas denominaciones dependiendo del tejido donde ejerzan finalmente su función. Los fagocitos polimorfonucleares abarcan los neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Los neutrófilos poseen una variedad de mecanismos para neutralizar a los patógenos; estas células tienen vida media corta, pues permanecen en circulación un promedio de 6 horas antes de entrar en apoptosis. Los basófilos y eosinófilos están relacionados a procesos más específicos como alergias e inmunidad contra helmintos, respectivamente. Todos ellos tienen participación en procesos inflamatorios (Beutler, 2004). Otras células involucradas son las células NK y NKT.

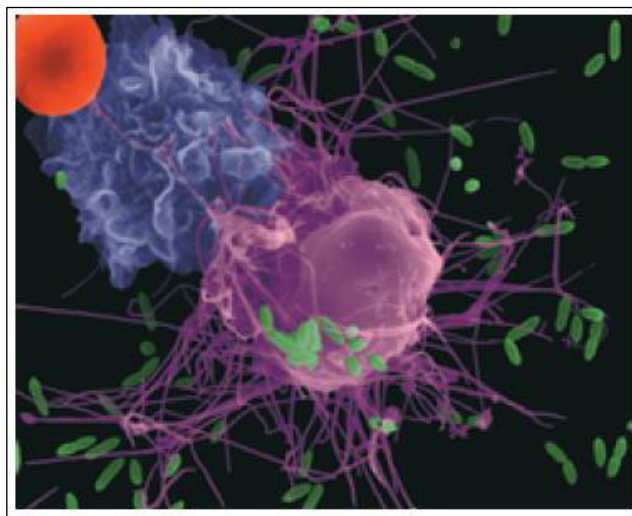


Figura 2. Electromicrografía de un macrófago (morado) atacando bacterias *E. coli*. Un monocito (azul) es reclutado próximo al macrófago debido a factores secretados por el macrófago. La esfera roja es un eritrocito (Inmunology. Janis Kuby, 2007).

Para el estudio de la respuesta inmune innata celular se debe discernir entre los elementos que intervienen en el reconocimiento (sensibilidad) de los antígenos, y los que participan en las estrategias efectoras. Estas células emplean una estrategia en la que con una cantidad limitada de receptores pueden reconocer un grupo de moléculas de origen microbiano que se mantienen conservadas entre un amplio número de taxones, ya que son indispensables para su desarrollo y no están sometidas a presiones de selección (Kimbrell & Beutler , 2001).

Los receptores involucrados en el reconocimiento de dichas moléculas se denominan PRRs (*pattern recognition receptor*) o receptores de reconocimientos de patrón, y a dichos patrones se les conoce ampliamente como PAMPs o patrones moleculares asociados a patógeno, que destacan por ser activadores de la respuesta inmune innata (Janeway, 1989).

Entre los activadores mejor caracterizados se encuentran una endotoxina o lipopolisacárido (LPS) común en la pared de las bacterias gramnegativas. Pfeiffer reportó algunos efectos biológicos de este LPS a finales del siglo XIX (Pfeiffer, 1892). Por otro lado, los PAMPs se pueden agrupar en dos grandes conjuntos: los comunes a una multitud de patógenos (por ejemplo LPS, peptidoglicano, RNA viral, entre otros) y

algunos que solo son compartidos por unos pocos grupos (por ejemplo la toxina tetánica).

Entre los PPRs se encuentran los TLR o receptores tipo toll (*toll-like receptors*), los cuales son similares a los receptores en insectos. A la fecha, se han reportado trece tipos de TLR en mamíferos, sin embargo en humanos, TLR 11 no se expresa (Hatai et al., 2016), mientras que TLR 12 y TLR13 no son funcionales (Balenga & Balenga, 2007). Los TLR funcionales descritos en *Homo sapiens* son 10, siendo TLR10 el último, descrito por Chuang & Ulevitch en la década pasada (2001). Todos ellos contienen varias características estructurales similares que incluyen repeticiones ricas en leucina en el dominio extracelular, y unos dominios “*toll/IL-1 receptor*” (TIR) citoplasmáticos asociados, los cuales interaccionan con otras proteínas en una cascada de señalización que conlleva a la activación de la célula (Figura 3A).

Se han descrito cinco dominios TIR en mamíferos: MyD88, MAL, TRIF (Ticam-1), MyD88-4 (TIRP o TRAM) y MyD88-5. La cascada de señalización central involucra el reclutamiento de IRAK-4 por MyD88, quien fosforila a IRAK-1 y 2. Luego se une TRAF-6 quien activa a TAK-1 y IKK- γ (Chuang & Ulevitch, 2001; Beutler, 2004). Esta cascada de señalización MyD88/IRAK/TRAF6 finalmente promueve la translocación del factor de transcripción (FT) nuclear kappa B (NF- κ B) (Figura 3B), quien es el que regula prácticamente todos los productos y citoquinas proinflamatorias como TNF- α que producen los monocitos/macrófagos, además de estar involucrado en varios otros procesos fisiológicos. Este FT está estrictamente regulado, se localiza de manera basal en el citoplasma de prácticamente todas las células inmunes y necesita de un estímulo para translocarse al núcleo (López-Bojorquez, 2004).

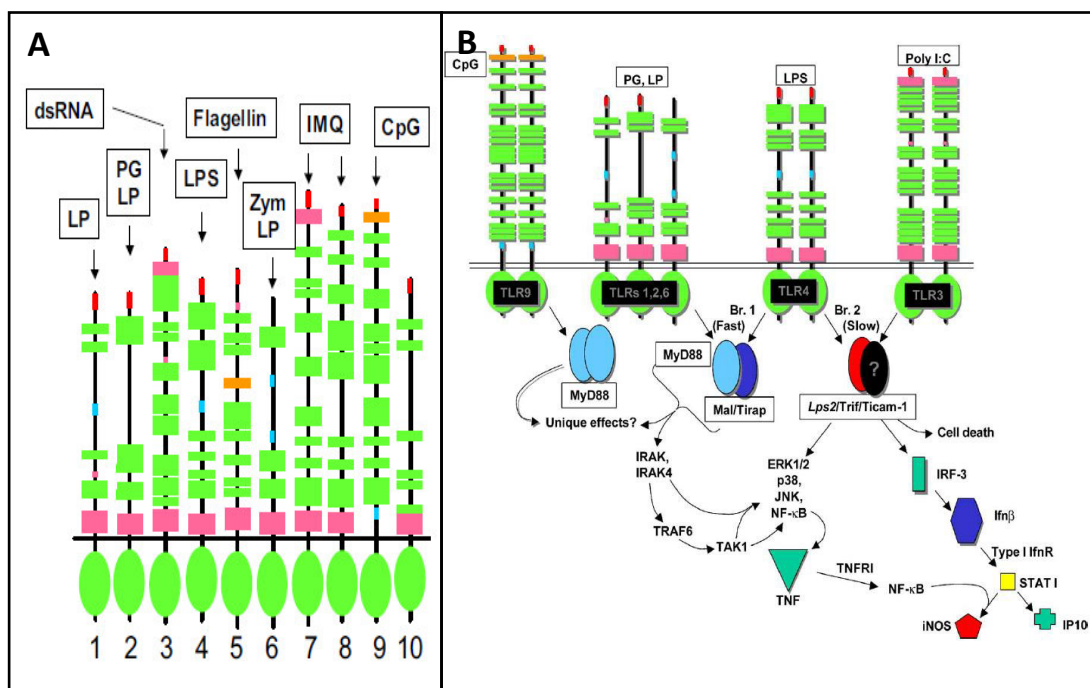


Figura 3. Receptores tipo Toll y las vías de señalización involucradas. A. Los 10 receptores tipo toll humanos y los ligandos respectivos. LP: Lipopeptido; PG: Peptidoglicano; Zym: Zymosan; LPS: Lipopolisacarido; CpG: DNA con islas CpG; IMQ: Imiquimod. **B.** Vías de señalización dependientes de TIR en mamíferos. Ambas vías, de NF-κB y STAT son activadas por diferentes TLRs, algunas veces con efectos sinergista. Los rectángulos representan repeticiones ricas en leucina. Los óvalos representan dominios TIR (Beutler, 2004).

Estos mecanismos de reconocimiento y activación de vías dependiente de TLR son muy dinámicos. Algunos TLRs, dependiendo de la célula y ligando correspondiente, pueden formar complejos y activar una cascada de señalización, que puede o no converger con la vía MyD88/IRAK/TRAFF6, para activar otra vía como la de STAT. Incluso se ha visto que existe una coestimulación entre los ligandos (Hoebe et al., 2003b). Por otro lado, se ha reportado que TLR4 usa hasta una cuarta proteína TIR desconocida en macrófagos (Hoebe et al., 2003a).

2.1.2 Mecanismos celulares efectores de la inmunidad innata

Los fagocitos como neutrófilos y macrófagos secretan citoquinas, como TNF- α , IL-1 o IL-12, que a su vez actúan sobre otras células inmunes activándolas o fomentando su reclusión al sitio de infección (respuesta inflamatoria) (Beutler, 2004; Chang, 2009). Producen además un arsenal de moléculas microbicidas, como las especies reactivas de oxígeno (Badwey, 1980; Nakawara, 1981) y las especies reactivas de nitrógeno (James, 1995).

2.1.2.1 Especies reactivas de oxígeno (EROs)

Algunas funciones esenciales de los fagocitos dependen en gran medida del “estallido respiratorio” que se produzca después de su activación, la cual puede ser por partículas extrañas u otros agentes como el forbol miristato acetato (PMA) (Badwey & Karnovsky, 1980). Dentro del fagosoma, se producen intermediarios de oxígeno en una secuencia de reacciones, iniciada por NADPH oxidasa, una enzima compuesta de cuatro subunidades; a partir del oxígeno molecular y el NADPH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido Fosfato), esta enzima genera el anión superóxido (O_2^-) que sirve de sustrato para generar otros potentes oxidantes como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Estos agentes oxidantes incluyen a los haluros como HOCl, que da origen al hipoclorito (OCl^-), y al radical hidroxilo (OH^\cdot), u ozono. Incluso, se puede formar peroxinitrito, a partir del anión superóxido y compuestos nitrogenados (Figura 4) (Badwey & Karnovsky, 1980; Nakawara, 1981; Beutler, 2004). Todos estos agentes son importantes para exterminar a los microbios, a través de blancos moleculares que incluyen lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

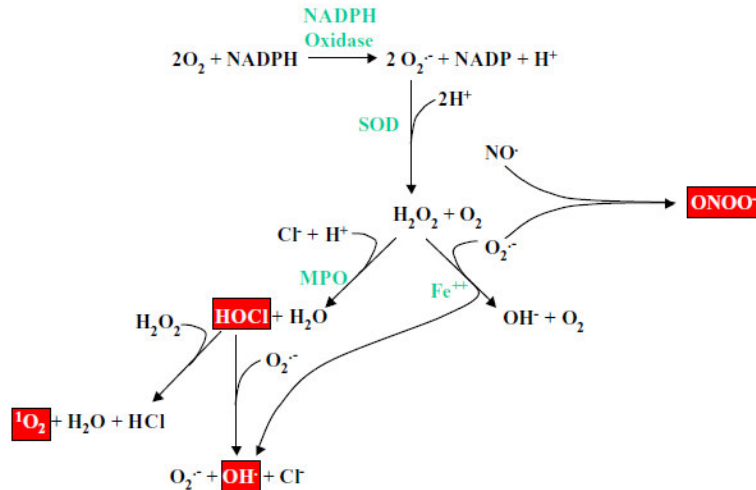
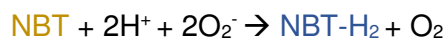


Figura 4. Generación de moléculas microbicidas por la maquinaria enzimática de un fagocito. Las vías representadas son válidas para neutrófilos y macrófagos. Las enzimas se muestran en verde y en rojo las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que son tóxicas para los microbios (Beutler, 2004).

Se han desarrollado metodologías para evaluar la activación de la maquinaria microbicida (“estallido respiratorio”) de los fagocitos sanguíneos. Una de éstas, ampliamente utilizada, es la reducción del *nitro-blue-tetrazolium* (NBT) por el anión superóxido. Esta técnica se ha utilizado desde sus inicios para evaluar inmunodeficiencias como la enfermedad granulomatosa crónica, en la que células fagocíticas pierden la capacidad de destruir ciertos patógenos, y se evidencia como una disminución en la reducción del NBT (Baehner & Nathan, 1968). El NBT es un complejo amarillo soluble que al ser reducido produce un compuesto en forma de cristales insolubles de color azul oscuro, denominado formazán. La formación de formazán permite evaluar la actividad de la NADPH oxidasa y la cantidad de anión superóxido producido en la vía dependiente de oxígeno que utilizan los fagocitos para producir EROs (Barrantes, 1975; Lomonte, 2009). En ensayos de inmunomodulación se emplean fagocitos provenientes de individuos sanos que incrementan la producción de formazán al ser activados por algún agente como LPS o PMA, evidenciándose por la intensidad del color azul. La reacción por la cual se producen los cristales de formazán es la siguiente:



Diversos autores han modificado la técnica original, desde la observación directa de los cristales de formazán por microscopia (Park et al., 1968), o algunas que utilizan lecturas espectrofotométricas luego de utilizar columnas de nylon (Segal & Petters, 1975), hasta la utilización de microplacas de ELISA para la lectura por espectrofotometría, post-solubilización de los cristales con KOH y DMSO (Muñoz & Alfaro, 2000).

2.1.2.2 Especies reactivas de nitrógeno

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso altamente reactivo que se encuentra relacionado con muchos procesos fisiológicos tales como la neurotransmisión, relajación del músculo liso y vasodilatación (Rosete et al., 1999); además cumple un papel importante como molécula efectora de la inmunidad innata (James, 1995). Se ha descrito la relación entre el NO y los procesos inflamatorios (Nussler & Billiar, 1993). Las enzimas responsables de la síntesis de NO se denominan NO Sintetas (NOS), y la realizan a partir de L-arginina y NADPH, formando L-citrulina y NO. Se ha logrado aislar y clonar tres isoenzimas de NOS: nNOS, eNOS e iNOS, similares en secuencia y estructura (Knowles & Moncada, 1994). Las dos primeras son constitutivas, dependientes de Ca^{++} y se expresan en neuronas y células endoteliales respectivamente. La iNOS, o NOS inducible es una enzima de 130 kDa, independiente de Ca^{++} y, como su denominación lo indica, se expresa después de haberse inducido previamente a células como macrófagos con citoquinas como la IL-1, IFN- γ y TNF- α o con productos bacterianos; éstas producen una cantidad mucho mayor de NO que las NOS constitutivas (James, 1995; Rosete et al., 1999). El control transcripcional de las iNOS ocurre a través de una estructura compleja de promotores y factores de transcripción, que involucra al FT NF- κ B cuando se activa por LPS, o a través de factores reguladores dependientes de IFN- γ (Martin et al., 1994).

El efecto microbicida del NO se fundamenta en la capacidad de inactivar rutas metabólicas críticas en los organismos objetivo. El NO inactiva varias enzimas clave que

tienen compuestos con grupos prostéticos con centro de hierro y azufre, como la aconitasa y ribonucleótido reductasa. También altera moléculas asociadas a las membranas mitocondriales como la NADH-ubiquinona oxidorreductasa, la succinato ubiquinona oxidorreductasa y el citocromo oxidasa C por unión reversible a su grupo hemo, por lo que la cadena respiratoria se ve afectada (Granger & Lehninger, 1982). Otro grupo de enzimas blanco son las encargadas de la reparación del DNA, provocando la muerte celular. Además, NO tiene la capacidad de reaccionar con el ion superóxido para formar peroxinitritos (ONOO^-) (James, 1995) (Figura 5). La vida media del NO es muy corta, por lo que se asume que las células efectoras deben estar cerca a los blancos. Asimismo, la regulación de la producción de NO está dada por otras citoquinas como IL-4 e IL-10 y, en gran medida, por el mismo NO. Esta regulación debe ser estricta, ya que el NO es capaz de dañar células y tejidos propios.

En solución acuosa, el NO rápidamente reacciona y forma nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Varias metodologías se han desarrollado para detectar la producción del NO generado por macrófagos activados, como la reacción de Griess que se fundamenta en una reacción de diazotización descrita originalmente por Griess (1879). A través de los años, se han hecho muchas modificaciones al protocolo original.

La reacción de Griess se muestra en la Figura 6, la cual utiliza sulfanilamida y NED en condiciones ácidas promovidas por el ácido fosfórico.

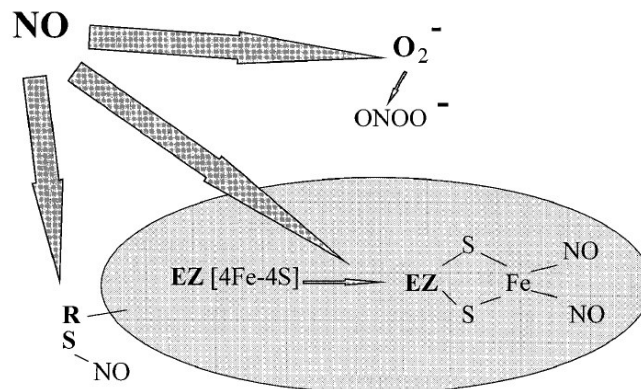


Figura 5. Algunas de las potentes reacciones del NO. La inactivación de enzimas críticas por las reacciones con centros de ión sulfuro para formar complejos de ión dinitrosi-dithiolato. Se muestra también las reacciones con ión superóxido que forma la altamente tóxica molécula de peroxinitrito y radical hidroxilo. Por otro lado, se observa la nitrosilación de centros nucleofílicos como tiol (James, 1995).

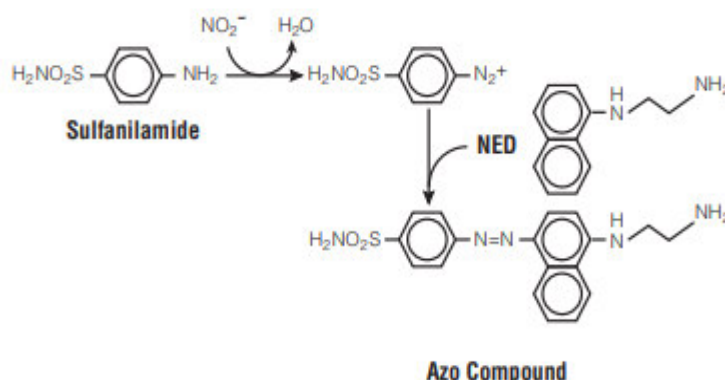


Figura 6. Reacción de Peter Griess. La sulfanilamida se combina con los nitritos en una primera reacción, para luego combinarse con NED y formar un compuesto coloreado (Inserto Promega Griess Reagent System, Cód G2930).

2.1.3 Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC)

La sangre es un tejido conjuntivo compuesto de plasma sanguíneo y células especializadas, tales como eritrocitos cuya función principal es el transporte de oxígeno, y leucocitos que participan en la respuesta inmune. De los leucocitos presentes, las PBMC presentan características particulares que les otorga un papel protagónico en investigación clínica. Estas PBMC agrupan a células efectoras de la respuesta celular

innata y adaptativa, pues están compuestas de linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales (NK) y monocitos que darán origen a macrófagos y células dendríticas (Denzler et al., 2010). Colona (2017) reportó que los monocitos constituyen alrededor del 20% de las PBMC en su grupo control empleando citometría de flujo y el marcador CD14+. Los monocitos adquieren un rol importante ya que constituyen el sistema fagocítico mononuclear, cuyas primera observaciones se dieron en el siglo XIX por Metchnikoff al describir la digestión de material extraño por células, además de encontrar sustancias que estimulan a los fagocitos presentes las cuales consideró responsables de la respuesta inflamatoria (Chang, 2009).

Las PBMC han sido notoriamente utilizadas para fines de diagnóstico, aprovechando varias de sus características. En primer lugar, al estar recorriendo el torrente sanguíneo, estas células interactúan con muchos tejidos del cuerpo lo que permite que puedan adoptar un patrón de expresión génica similar a determinado órganos. Por ejemplo, el patrón de expresión génica de estas células se ve afectada por variaciones en la dieta, especialmente sobre genes relacionados con el metabolismo energético y obesidad normalmente expresados en el hígado (de Mello et al., 2012; Reynés, 2014). Por otro lado, al estar constituidas por células inmunes innatas y adaptativas, se puede observar un patrón de expresión diferencial de biomarcadores entre individuos sanos y afectados por alguna enfermedad del sistema inmune, como es el caso de la expresión génica de las citoquinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 en lupus eritematoso (Csiszar et al., 2000), expresión de genes en HIV (d'Ettorre et al., 2010), microRNAs y expresión de TNF- α e IL-1 β en artritis reumatoidea (Li et al., 2013), entre otras enfermedades. De esta manera, adquieren la característica de servir como fuente para la identificación de biomarcadores que puede contribuir al diagnóstico temprano de alteraciones metabólicas o enfermedades.

Adicionalmente, muchos investigadores han probado el efecto de algunas sustancias sobre cultivos de PBMC de individuos sanos para determinar el posible

potencial inmunomodulador. Esta herramienta toma notable interés para poder evaluar extractos provenientes de algunas plantas, que pueden haber sido utilizadas previamente como fuente medicinal (Denzler et al., 2010).

2.2 Inmunomoduladores

En la actualidad, los tratamientos médicos comunes desarrollados para una gran variedad de enfermedades utilizan fármacos que producen efectos secundarios o incluso generan resistencia en determinado grupo de organismos infecciosos. Es por eso que se ha puesto especial énfasis en la utilización de productos químicos de origen natural para fines médicos. Newman y Cragg (2012) hicieron un recuento de estos productos encontrados desde 1981 hasta 2010, que pueden ser fuentes de nuevas drogas, anotando un total de 28 frente a 44 productos químicos sintéticos.

Así pues, se han descrito productos que tienen la capacidad de modular la respuesta inmunitaria y se conocen como inmunomoduladores; pueden actuar potenciando o suprimiendo la respuesta inmune, y ser aprovechados de acuerdo a la necesidad (Takx-Köhlen, 1992). Los inmunomoduladores producen un efecto biológico o farmacológico sobre los mecanismos moleculares y celulares que gobiernan el equilibrio de la respuesta inmune innata y/o adaptativa. Estos pueden actuar de forma específica o inespecífica, dependiendo si la acción va dirigida a un antígeno determinado o no (Martínez Manrique, 2006).

La búsqueda de nuevos productos con actividad inmunopotenciadora constituye una de las tendencias más importantes en la investigación inmunológica desde hace mucho tiempo, las cuales pueden ser suministradas a pacientes inmunocomprometidos o pueden funcionar como adyuvantes en el diseño de nuevas vacunas (Morris et al., 1999).

Las plantas medicinales han acompañado al ser humano desde la más remota antigüedad. Todas las culturas han desarrollado su propia flora medicinal, que

generalmente es transmitida por tradición oral (Salaverry y Cabrera, 2014). Sin embargo, como consecuencia del establecimiento de las urbes en el mundo, y por consiguiente un alejamiento de las fuentes naturales de estas plantas, se ha perdido gran parte de este arraigo cultural.

Algunas plantas como *L. meyenii* son una fuente importante de inmunomoduladores (Sifuentes-Penagos et al., 2015). Diversos autores han atribuido estas propiedades a determinados compuestos, tales como flavonoides, tocoferoles, polifenoles, saponinas, cumarina, esteroides, entre otros (Fulzele et al., 2003; Nagarathna et al., 2013). Se tiene registro de plantas medicinales que no sólo exhiben actividad inmunomoduladora, sino también una amplia gama de actividades antioxidantes, antiasmáticas, antiarrítmicas, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, hipocolesterolémicas, antifúngicas, cardiotónicas, diuréticas y otras medicinales (Nagarathna et al., 2013); sin embargo, no se conoce con certeza el mecanismo de acción de estos productos (López-Luengo, 2008).

Diversas investigaciones han demostrado que el mecanismo por el cual actúan estos productos es múltiple. López-Luengo (2008) hizo una revisión de algunas plantas conocidas por presentar estas propiedades y expuso que, por ejemplo, *Echinacea purpurea* (L.) Moench tiene la capacidad de aumentar los niveles de properdina, la cual participa en la activación de la vía alternativa del complemento y se traduce en una mejor respuesta antibiótica. Además, algunos polisacáridos como la inulina ejercen un efecto en la activación de células T. Asimismo se ha comprobado que un extracto de raíces de esta planta estimula la producción de IFN y ejerce una actividad antiviral específica contra el virus de la influenza, herpes, entre otros. Pleager (2003) refiere que tanto en estudios *in vivo* (ratones) como *in vitro*, los fármacos a base de hierbas afectaban la secreción de citoquinas, la secreción de inmunoglobulina y el “switch isotópico”, la expresión de co-receptores celulares, la proliferación de linfocitos y la actividad citotóxica (Pleager, 2003).

Muchos autores han aplicado diversas estrategias para extraer la mayor cantidad de metabolitos de las plantas, utilizando para ello solventes orgánicos como etanol, metanol o cloroformo en la preparación de extractos. Así por ejemplo, Llanes (2009) evaluó el efecto inmunomodulador del extracto metanólico de 10 plantas de la familia euphorbiaceae, encontrándose (entre otros efectos inmunomoduladores) que promovían la síntesis de TNF- α por PBMC y la proliferación de linfocitos.

2.3 *Lepidium meyenii* Walpers: MACA

La maca es una planta de la familia Brassicaceae (véase la taxonomía en la Tabla 1) nativa de nuestros Andes, que crece en suelo altiplánico alrededor de los 4000 m.s.n.m y ha sido cultivada por más de 2000 años, desde la época preincaica (Obregón, 1999; Gonzales et al., 2009). Se ha convertido en un potencial recurso agronómico de gran valor para el Perú por su excelente adaptabilidad a los rigores climáticos de las elevadas regiones andina, tales como el intenso frío, baja presión atmosférica, lluvias, vientos y alta radiación solar y cósmica.(Obregón, 1999; Gonzáles, 2010). Además, presenta no sólo un alto valor nutricional, sino también es valorada por su papel medicinal provocando que se investiguen y describan sus propiedades terapéuticas y biológicas por muchos autores (Gonzales et al., 2014; Sifuentes-Penagos et al., 2015).

Tabla 1. Clasificación taxonómica* de *Lepidium meyenii* Walpers

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Streptophyta
Superdivisión	Embryophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Rosanae
Orden	Brassicales
Familia	Brassicaceae
Género	<i>Lepidium</i>
Especie	<i>Lepidium meyenii</i> Walp.

*Sistema integrado de información taxonómica.
 Disponible en <https://www.itis.gov/>



Figura 7. Hipocótilos de *Lepidium meyenii* Walpers. Nótese la variedad de colores que determinan su ecotipo (Foto: Grupo de investigación en Inmunomoduladores y Antitumorales de Origen Natural y Sintético-UNMSM).

2.3.1 Descripción botánica y cultivo

La maca es una planta pequeña que crece arrosetada y al ras del suelo, en las condiciones inhóspitas de la puna. Se ha postulado que algunos metabolitos como los glucosinalatos están asociados a la resistencia de algunas brasicáceas ante el estrés abiótico (Del Carmen, et al., 2013). Fue el botánico Hipólito Ruiz quien reportó, entre 1777-1788, las áreas de producción y consumo de maca, haciendo referencia a Carhuamayo, Pampas de los Reyes (Junín) y Ninacaca (Pasco), todos situados por encima de 4000 m.s.n.m, donde por el intenso frío no crecía nada excepto esta planta milenaria (Gonzáles, 2010). Debido a la gran demanda, su cultivo se ha extendido hasta las regiones de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Huánuco, Huancavelica y Puno (Cárdenas, 1995). El lugar del cultivo es de suma importancia, ya que se conoce que las variaciones reportadas en cuanto a la composición de metabolitos están más relacionadas a este factor, que al propio color del ecotipo (Zhao et al., 2012)

Su ciclo de vida tiene dos etapas claramente definidas: la primera o vegetativa es donde se produce la raíz o hipocótilo, la cual es tuberosa, de diversos colores (ecotipos) y es aprovechada por la población como alimento y para otros fines. La otra etapa conocida como reproductiva consiste en la floración y producción de semilla botánica; ambas etapas se completan en dos años consecutivos y, por ello, se conoce como un cultivo bienal (Gonzáles et al., 2014; Cárdenas, 1995).

La maca en su fase vegetativa presenta hojas bipinnatisectas, con folíolos opuestos. Cada folíolo está dividido en segmentos foliares con borde profundamente lobulado. Sus flores son muy pequeñas, con pétalos de color blanco y sépalos que varían entre verde y violáceo. Estas flores están reunidas en inflorescencias en panícula y el conjunto de éstas forma la roseta de la fase reproductiva (Figura 8). Sus frutos son silículas que se caracterizan por tener solamente dos semillas por fruto. Los hipocótilos son producto de la acumulación de sustancias de reserva por parte de la planta y su

color es el que se considera para clasificar los diferentes ecotipos, siendo el ecotipo amarillo el más abundante (Cárdenas, 1995).

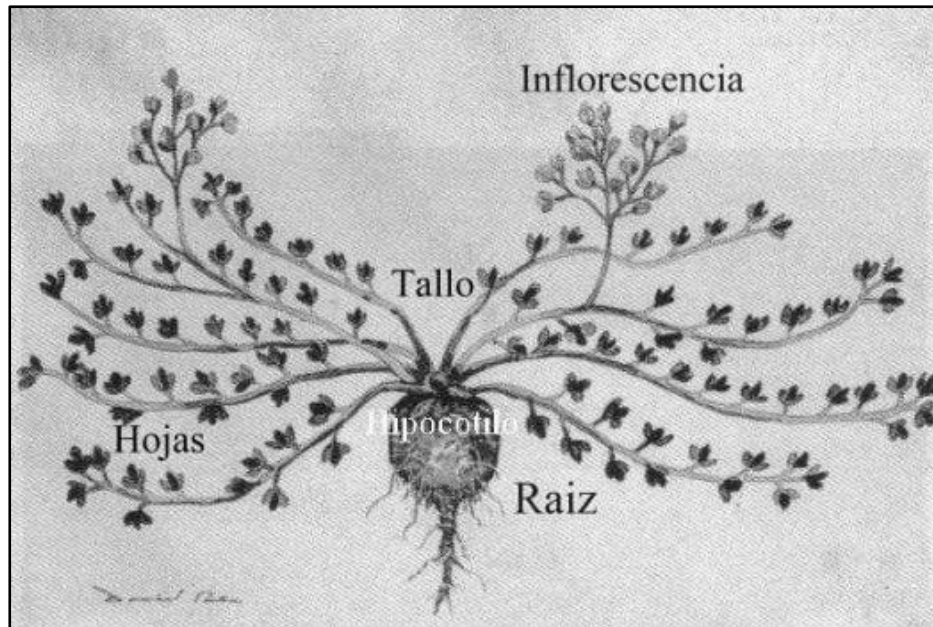


Figura 8. Estructura de *Lepidium meyenii*. El valor nutritivo se aprovecha generalmente del hipocótilo. El tallo y las hojas crecen arrosetadas en en suelo.

2.3.2 Valor nutricional y composición fitoquímica

El alto valor nutricional de la maca es alto, destacado desde la época preincaica hasta la actualidad, siendo fuente valiosa de proteínas, grasas, carbohidratos, fibra, vitaminas (caroteno, tiamina, riovflavina, ácido ascórbico, niacina), alto contenido de minerales como calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio, además de cobre, zinc, manganeso, hierro y selenio. Su contenido proteico es incluso muchísimo más alto que el presente en la papa y zanahoria (alrededor de 10% del peso seco). Es además fuente importante de ácidos grasos insaturados como linoleico y oleico, entre otros (Dini et al., 1994; Obregón, 1998).

Yllescas (1994) realizó un estudio sobre la composición química y nutricional de los ecotipos amarillo, rojo y negro y respecto a los metabolitos secundarios identificó tres fracciones de alcaloides y una flavonoide, además de la presencia de esteroides, triterpenos, compuestos fenólicos, cumarinas, taninos, glucósidos, saponinas,

aminoácidos libres, aminos, entre otros. Asimismo, pudo concluir que entre los ecotipos no existe gran variación en cuanto a proteínas, fibras, grasa y carbohidratos; sin embargo si encontró diferencias en las concentraciones de minerales como el calcio y hierro. También se ha reportado mayor contenido de flavonoides en el ecotipo rojo (Yllescas, 1994; Álvarez, 2008).

Zhao et al., (2012) hicieron un análisis de la composición de metabolitos y nutrientes usando resonancia magnética nuclear. Entre los metabolitos secundarios que encontraron se tienen a algunos aminoácidos, adenina, ácido fumárico, ácido málico, fitoesteroles, ácidos grasos, GABA, sucrosa, macamidas, entre otros. Reportaron que existe diferencia significativa entre los niveles de dichos metabolitos al comparar muestras provenientes de distintos lugares de cultivo, además de la comparación entre ecotipos. Concluyen que esas diferencias estarían más relacionadas a la zona de procedencia que al color del ecotipo (Zhao et al., 2012), por lo que se le atribuye especial importancia a las condiciones de cultivo que conllevan al almacenamiento de diferentes metabolitos por la planta en sus hipocótilo debido a una fuente diferencial de nutrientes de los suelos.

De manera similar, Palma-Gutiérrez et al. (2012) realizaron la marcha fitoquímica a muestras de maca de distintas procedencias, extrayendo los metabolitos con solución hidroalcohólica y evidenciando la presencia de los mismos con métodos espectrofotométricos. Estos autores encontraron de manera constante la presencia de alcaloides entre las muestras estudiadas, además de encontrar flavonoides, antocianinas, taninos, fenoles, triterpenos, esteroides, lactonas y cumarinas, pero todas estas últimas de manera variable entre las muestras (Palma-Gutiérrez et al., 2012).

Torres (2008) evaluó la presencia de saponinas, flavonoides y alcaloides entre extractos acuoso, metanólico y clorofórmico, reportando la mayor presencia de alcaloides en el extracto clorofórmico, seguido del metanólico, mientras que el extracto acuoso presenta mayor cantidad de saponinas.

Varios investigadores han atribuido especial importancia a algunos metabolitos secundarios presentes en la maca, destacando su importancia por ser fisiológicamente activos. Entre estos metabolitos secundarios se incluyen a los flavonoides, glucosinolatos, isotiocianatos, alcaloides y unos compuestos presentes exclusivamente en esta especie denominados macaenos y macamidas (Muhammad et al., 2012; Sifuentes-Penagos et al., 2015). Los glucosinolatos están particularmente presentes en la familia Brassicaceae (Del Carmen et al., 2013). Se han logrado aislar nueve tipos de glucosinolatos de los cuales glucotropaeolin es el más abundante, aunque la mayoría son aromáticos (Sifuentes-Penagos et al., 2015; Li et al., 2001; Dini et al., 2002). También se ha reportado que la cantidad de glucosinolatos en maca fresca es de 1% y es mayor al encontrado en otras brasicaceas. Sin embargo, la proporción de este metabolito está relacionado con el contenido acuoso de la planta y se encuentra disminuida cuando el hipocótilo se ha deshidratado o procesado (Li et al., 2001). Los isotiocianatos son producto de la hidrólisis de los glucosinolatos, producto de la enzima mirosinasa. Álvarez (2008) también hace énfasis en la presencia de glucosinolatos e isotiocianatos, metabolitos reportados en otras brasicaceas (Molina-Vargas, 2013).

Entre los alcaloides aislados de la maca, destacan dos alcaloides imidazólicos denominados lepidilina A y B, cuyo compuesto corresponde a 1,3-dibencil-4,5-dimetilimidazolium chloride y 1,3-dibencil-2,4,5-trimetilimidazolium chloride respectivamente (Cui et al., 2003), además de otros derivados denominados macaínas e isopteropodina (Cuentas et al., 2008).

Muhammad et al. (2002) han logrado identificar constituyentes de los tubérculos de maca, determinando la presencia de derivados bencilados de 1,2-dihidro-N-hidroxipiridina, llamado macaridina, junto con las alcamidas bencilados (macamidas), N-bencil-5-oxo-6E, 8E-octadecadienamida y N-benzylhexadecanamida, así como el ácido cetoacíclico y macaeno (5-oxo-6E, 8E-ácido octadeca-dienoico); mediante la metodología de NMR (Muhammed et al., 2002).

Todos estos metabolitos destacan por su actividad biológica sobre determinados sistemas u órganos, pudiendo redundar en efectos benéficos para los mismos. De hecho, se han realizado numerosas pruebas en base a extractos con metabolitos, pudiéndose comprobar efectos fisiológicos protectores y curativos en humanos y animales.

2.3.3 Actividad biológica y terapéutica de *Lepidium meyenii*

Se han descrito sus propiedades terapéuticas y biológicas por diversos autores (Gonzales et al., 2014; Sifuentes-Penagos et al., 2015). Entre los efectos que más destacan, están los que se dan sobre la función sexual (Gonzales et al., 2014) y fertilidad, mejorando parámetros espermáticos en humanos (ecotipo negro) (Gonzales et al., 2001) y roedores. También se ha reportado su efecto como energizante en deportistas (Stone et al., 2009), y en mujeres menopáusicas se ha demostrado que mejora la presión arterial diastólica (Stojanovska et al., 2015).

En ratones se ha logrado revertir la subfertilidad inducida con fármacos como ketoconazol y campos electromagnéticos al administrarles extracto acuoso de maca amarilla (Valdivia et al., 2016). También se ha evaluado el efecto de este extracto en el desarrollo embrionario de ratón, no encontrándose efectos negativos; por el contrario, tras la evaluación morfológica, se pudo observar que hubo menor porcentaje de embriones degenerados provenientes de ratonas tratadas con este extracto. (D'Arrigo, et al., 2004). En otro tipo de estudios, se analizaron los efectos de tres ecotipos de maca (roja, negra y amarilla) sobre la función cognitiva en ratones ovariectomizados utilizando la prueba de "búsqueda de agua". En dicho estudio se determinó que la maca negra tiene el mejor efecto sobre el aprendizaje para ubicación espacial (Rubio et al., 2006). Varios de los efectos biológicos y terapéuticos de la maca sobre diferentes especies se exhiben en la Tabla 2.

2.3.4 Potencial inmunomodulador de *Lepidium meyenii*

Desde la década pasada, se han realizado diversos estudios sobre las propiedades inmunomoduladoras de esta brassicácea. Alzamora (2003) demostró que la administración oral de extracto clorofórmico (alcaloidal) del ecotipo amarillo conlleva a un aumento del título de anticuerpos e incrementa la capacidad fagocítica en ratones. Además, favoreció la inmunidad celular en ratones inmunosuprimidos por metilprednisona.

En 2007, Alzamora et al. (2007c) reportaron el efecto del extracto metanólico (EM) de los ecotipos blanco, morado, rojo y negro sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón, encontrándose que el ecotipo morado a la concentración de 800µg/mL indujo mayor generación de este producto, comparado con el grupo control. Ese mismo año, Alzamora et al. (2007a) describieron la actividad leishmanicida de los ecotipos antes mencionados, basándose en la reducción de la cantidad de promastigotes en cultivos *in vitro*. Como resultado se obtuvo que el EM del ecotipo morado fue el más efectivo a 400 µg/mL, y tuvo su mejor efectividad al segundo día de enfrentamiento. Se consideró que los alcaloides imidazólicos presentes en el EM estarían ejerciendo esta acción sobre los promastigotes de *Leishmania braziliensis peruviana*.

Tabla 2. Efectos biológicos y terapéuticos de *Lepidium meyenii* Walpers sobre diferentes especies

Especie	Efecto biológico o fisiológico	Referencia
RATAS	Incremento recuento espermático	Gonzales et al., 2004
	Mejora del comportamiento sexual	Chung et al., 2005; Cicero et al., 2001
	Mejoras nutricionales	Canales et al., 2000
	Antiestrés	Tapia et al., 2000; Lopez-Fando et al., 2004
	Preventivo de hiperplasia prostática inducida con testosterona	Gonzales et al., 2005
	Mejora condiciones de osteoporosis	Zhang et al., 2006
	Mejora la memoria espacial	Rubio et al., 2006
	Protección contra exposición a UVA, UVB, UVC	Gonzales & Gonzales, 2008
	Favorece la respuesta organica ante situaciones estresantes (adaptógeno)	Suárez et al., 2009
RATÓN	Mejora el comportamiento sexual	Zheng et al., 2000
	Incrementa la supervivencia de embriones	Ruiz-Luna et al, 2005
	Efecto benigno en desarrollo de embriones preimplantacionales	D'Arrigo et al., 2004
	Revierde la subfertilidad inducida por campos magnéticos	Valdivia et al., 2016
	Reduce niveles de azúcar en ratones con diabetes inducida	Gonzales et al., 2013
COBAYO	Incrementa el número de descendencia	Álvarez, 1993
HUMANO	Mejora parámetros espermáticos	Gonzales et al., 2001
	Incrementa el deseo sexual	Zenico et al., 2009
	Energizante en deportistas	Stone et al., 2009
	Presión arterial diastólica en mujeres menopáusicas	Stojanovska et al, 2015
	Mejora condiciones en osteoartritis	Mehta et al., 2007
	Mejores condiciones físicas y metabólicas, mejor IMC	Gonzales et al., 2010
	Bajos niveles de IL-6 sérico en habitantes a mas de 4000m.s.n.m	Gonzales et al., 2013
PECES	Efectos proinflamatorios <i>in vitro</i>	Alzamora et al., 2007d; Zhang et al., 2016
	Aumenta la sobrevivencia de alevines y juveniles	Lee et al., 2004
Gonzales et al., 2009 (Adaptado por Huayhua, 2018)		

También se ha reportado actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales de esta brassicacea. Alzamora et al., (2007b) evaluaron la actividad del EM de tres ecotipos (amarillo, negro y morado) sobre las líneas celulares HeLa y HT-29 a través de la prueba de MTT. Se encontró que el EM del ecotipo amarillo presenta actividad antitumoral superior a los otros dos ecotipos.

Molina-Vargas, L. F. (2013) en su revisión, indica que los isotiocianatos, originados a partir de la degradación enzimática de los glucosinolatos, están presentes en las brassicaceas (crucíferas) y exhiben propiedades anticarcinogénicas por sus habilidades de inducir genes citoprotectores. Los mecanismos de efectos citotóxicos y citostáticos de los isotiocianatos incluyen inducción de apoptosis, inhibición de angiogénesis e inhibición de la progresión del ciclo celular.

Se ha descrito un efecto estimulante sobre la producción de IFN- γ del EM del ecotipo morado en cultivo PMBC, evidenciado por ELISPOT (Alzamora et al., 2007d). Leiva-Revilla et al. (2014) estudiaron *in vivo* la producción de esta misma citoquina en ratas ovariectomizadas y tratadas con extracto hidroalcohólico del ecotipo rojo y también reportó un incremento en su producción a través de ELISA en muestra de suero sanguíneo, lo que sugiere que este extracto podría mejorar parámetros de inmunidad celular (actividad de células Th1) en mujeres posmenopáusicas.

Álvarez (2008) demostró que el EM de maca morada produjo un incremento en la masa y el número de células en órganos linfoides como el timo y el bazo de ratones. Además, el ecotipo blanco produjo un incremento en la cantidad de anticuerpos hemaglutinantes y fijadores de complemento.

Torres (2008) obtuvo resultados similares a los de Álvarez (2008) con extracto acuoso, metanólico e hidroalcohólico, trabajando con ratones previamente inmunosuprimidos con ciclofosfamida. Además, demostró que los ratones lograron incrementar sus niveles de hemoglobina.

Con respecto a su participación en los procesos inflamatorios, se han reportado resultados controversiales. Tsai et al., (2010) demostraron que los componentes bioactivos *indole-3-carbinol (I3C)* and *β -phenylethyl isothiocyanate (PEITC)*, presentes en las plantas de la familia Brassicaceae, producen una inhibición de los mediadores de la inflamación, como NO y TNF- α en macrófagos (línea RAW264.7) estimulados con LPS.

En estudios recientes se ha encontrado moléculas provenientes de *Lepidium meyenii* con actividad proinflamatoria. Wang et al., (2016) purificaron un polisacárido de “maca”, denominado MP21. Este MP21 fue sometido a pruebas *in vitro* a fin de evaluar su actividad inmunomoduladora sobre macrófagos (RAW264.7). Se encontró un aumento dosis-dependiente sobre la secreción de NO, TNF- α e IL-1 β y producción de especies reactivas de oxígeno.

Zhang et al., (2016) describieron otro polisacárido proveniente de un extracto acuoso de maca. Este polisacárido fue denominado MC-1 y evidenció actividad inmunomoduladora sobre macrófagos, encontrándose un aumento en la producción de NO, TNF- α e IL-6. Los autores concluyen estos resultados podrían ser alentadores para pacientes con inmunidad comprometida. Alzamora et al. (2007d) describió un aumento de la citoquina proinflamatoria IFN- γ en PBMC empleando EM del ecotipo morado.

Por otro lado, Gonzales et al., (2013) reportaron niveles bajos de la citoquina IL-6 en el suero de individuos que consumieron maca y que residen a más de 4000 m.s.n.m. Gasco (2014) empleó un modelo de hiperplasia inducida con enantato de testosterona sobre la próstata y vesículas seminales de ratas para probar el efecto del extracto hidroalcohólico atomizado del ecotipo rojo de maca sobre éstas. Se encontró que este extracto tiene un efecto antiinflamatorio, evidenciándose en el descenso en los niveles de TNF- α secretado (detectado por ELISA) por las células de los tejidos experimentales, principalmente en tejido prostático. Este resultado, según el autor, se correlaciona con un incremento en los niveles de IFN- γ . Dicho trabajo, hecho en conjunto con Gonzales

et al., y el reportado por Gonzales et al., (2013) fueron tomados como referencia para que Caballero-Gutiérrez & Gonzales (2016) incluyan a *L. meyenii* en su lista de alimentos con propiedades antiinflamatorias, sin considerar las variaciones del efecto por los ecotipos amarillo y morado reportado por otros autores.

El presente estudio tiene como objetivo demostrar el efecto del ecotipo morado de maca sobre la expresión génica y secreción *in vitro* de TNF- α por PBMC; esta citoquina es clave en el establecimiento de procesos inflamatorios y tiene múltiples funciones. De esta manera se podrá obtener mayor evidencia molecular que permita caracterizar mejor este efecto.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis (H₁)

El extracto metanólico de *Lepidium meyenii*, Walpers (ecotipo morado) presenta metabolitos secundarios con actividad inmunomoduladora verificable por la expresión y secreción de TNF- α por células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).

3.2 Hipótesis nula (H₀)

El extracto metanólico de *Lepidium meyenii*, Walpers (ecotipo morado) presenta metabolitos secundarios que no tienen actividad inmunomoduladora verificable por la expresión y síntesis de TNF- α por células mononucleares de sangre periférica

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad inmunomoduladora *in vitro* de un extracto metanólico de *Lepidium meyenii*, Walpers (ecotipo morado) sobre la expresión y secreción de TNF- α por PBMC.

3.3.2 Objetivos específicos

- a. Elaborar un extracto metanólico de *Lepidium meyenii* (ecotipo morado).
- b. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto sobre la viabilidad de PBMC *in vitro*.
- c. Determinar dos parámetros de inmunidad innata celular: la producción de especies reactivas de oxígeno (explosión respiratoria) y de nitrógeno (óxido nítrico) por PBMC.
- d. Verificar la expresión génica y secreción del Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) por PBMC.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material Biológico

4.1.1 Ejemplares de *Lepidium meyenii*, Walpers ecotipo morado

Los ejemplares de *L. meyenii* (Figura 9) fueron colectados en el distrito de Carhuamayo, departamento de Junín, ubicado en las coordenadas latitud -10.9288S y longitud -76.0611E a una altura de 4120 m.s.n.m., en colaboración con investigadores del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición "Alberto Guzmán Barrón" de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.



Figura 9. Ejemplares de *L. meyenii* (ecotipo morado) colectados en el departamento de Junín.

4.1.2 Muestra de sangre periférica humana

La muestra sanguínea fue tomada por venopunción de las venas media o cefálica de individuos varones sanos con el sistema Vacutainer® en tubos heparinizados, previo consentimiento informado firmado (Anexo 10).

4.2 Preparación de harina de *L. meyenii*

Los hipocótilos se lavaron exhaustivamente con agua destilada para eliminar cualquier contaminante y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,5%. Posteriormente se cortaron en trozos para dejarlos secar en estufa por 3 días a 40°C. Las raíces deshidratadas se convirtieron en harina fina con la ayuda de un molino eléctrico (Figura 10). Dicha harina fue almacenada a temperatura ambiente hasta su utilización.



Figura 10. Preparación de harina de hipocótilo de *L. meyenii* (ecotipo morado).
A. Molienda de maca deshidratada. **B.** Harina de "maca morada".

4.3 Obtención del extracto metanólico de *Lepidium meyenii*, Walpers ecotipo morado

Se pesaron 50 gramos de la harina obtenida y se colocaron en un frasco color ámbar con 100 mL con metanol químicamente puro (QP) (relación 1:2 p/v) durante 10 días a temperatura ambiente con agitación vigorosa diaria (Alzamora et al., 2007b).

Culminado el tiempo, se filtró el macerado en un sistema compuesto por un embudo de Buchner con papel Whatman® y un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío, extrayendo así toda la fase líquida. Dicha fase líquida se concentró hasta $\frac{1}{4}$ del volumen inicial, con la ayuda de una estufa de aire circulante a 40 °C. Luego se distribuyó el volumen resultante en placas Petri de vidrio en una cabina extractora de gases para dejar evaporar todo el solvente (Figura 11 y 12).

Finalmente, el extracto se colectó en viales debidamente rotulados y fueron almacenados a 4°C hasta su uso.

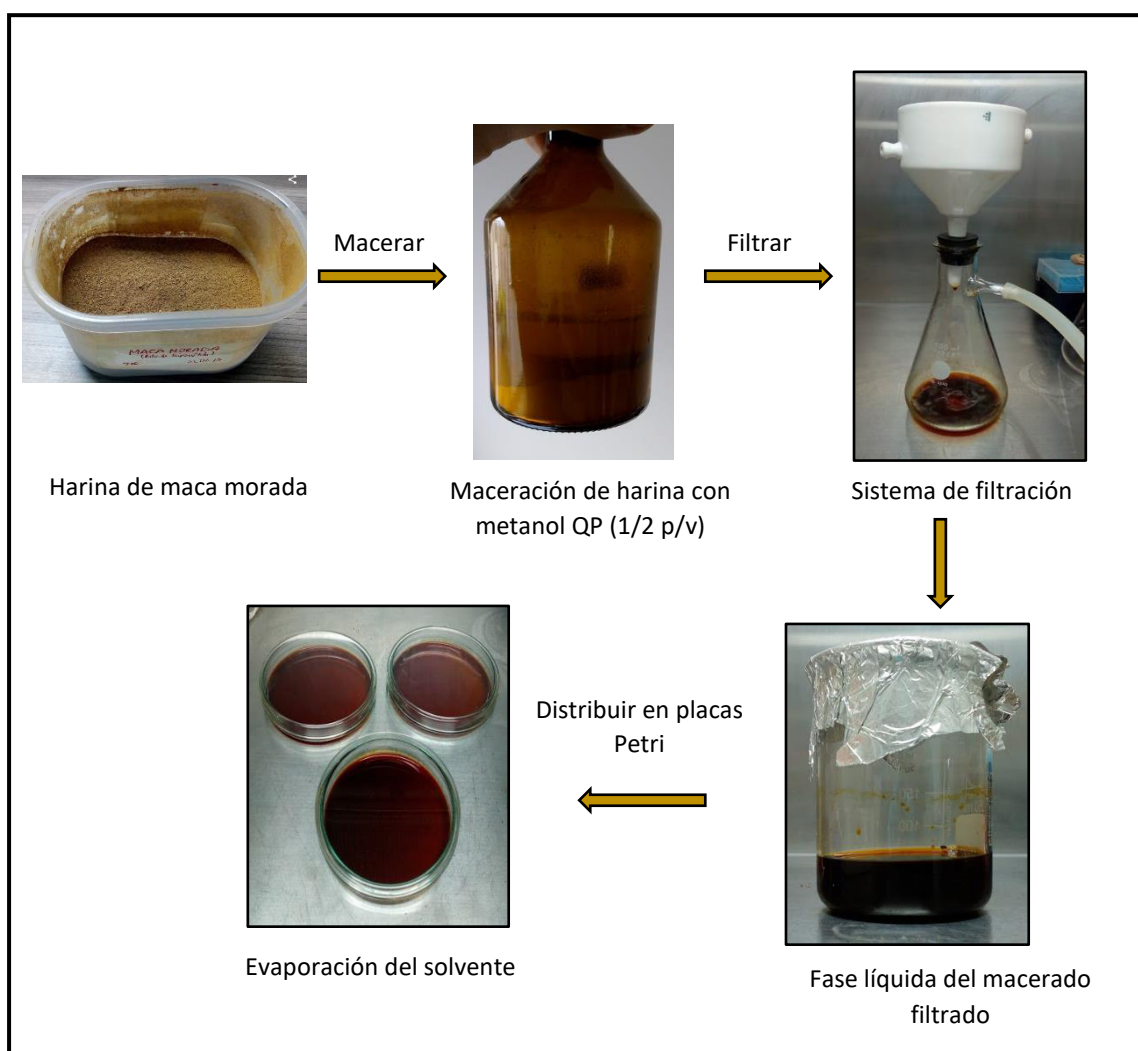


Figura 11. Proceso de elaboración de extracto metanólico de “maca morada”. La harina es pesada y mezclada con metanol QP en la relación $\frac{1}{2}$ p/v. La mezcla se agitó vigorosamente durante los 10 días de maceración. Tras ese tiempo, la fase líquida es filtrada para posteriormente ser concentrada. Todo el solvente es evaporado y el extracto es colectado en viales debidamente rotulados.

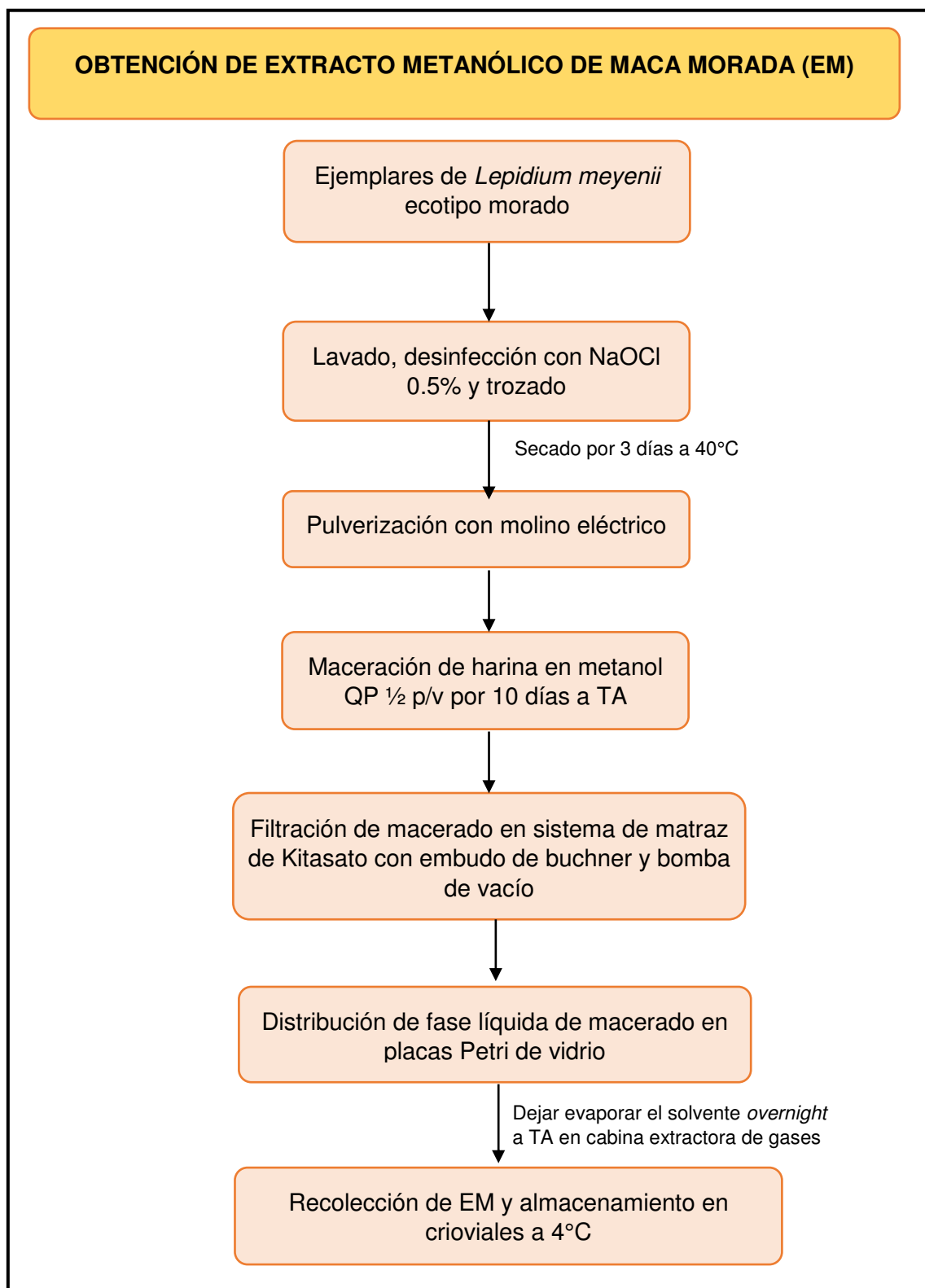


Figura 12. Flujograma para la elaboración de extracto metanólico de maca morada.

4.4 Determinación de la composición fitoquímica y capacidad antioxidante

En el Instituto de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Nacional Agraria La Molina se realizó la determinación de metabolitos secundarios: polifenoles, flavonoides y antocianinas.

La determinación de polifenoles totales se hizo con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu la cual se basa en una reacción de óxido-reducción donde los compuestos fenólicos reducen el reactivo de Folin en medio básico, dando lugar a un complejo color azul. Para la extrapolación de unidades de absorbancia en concentración de polifenoles totales, se preparó una curva estándar con ácido gálico (Anexo 9A). Los resultados se expresaron como miligramos de ácido gálico por cada gramo de EM.

La determinación de flavonoides se realizó empleando el método de Shinoda, este se utiliza para flavonoides con tengan es su estructura un núcleo benzopirona como las flavonas, flavonoles, flavanonas, etc. producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas adicionando magnesio seguido de ácido clorhídrico concentrado. Se hallaron las concentraciones de flavonoides a partir de una curva estándar realizada con rutina (Anexo 9B). Los resultados se expresaron en miligramos de rutina por cada gramo de EM.

La cuantificación de antocianinas se hizo mediante el método de pH diferencial, el cual aprovecha la propiedad de las antocianinas de presentar cambios estructurales reversibles dependiente del pH; así, a pH=1 predomina la forma coloreada oxónica, mientras que a pH=4.5 la forma predominante es la hemiacetal incolora. De esta manera la diferencia de absorbancias es proporcional al contenido de antocianinas totales. Para poder conocer el contenido de antocianinas, se utilizó la ecuación de Lambert-Beer $A=E \cdot C \cdot L$, donde A es la absorbancia, E representa al coeficiente de extinción molar. C a la concentración molar y L el diámetro de la celda de espectrofotometría. Los

resultados se expresaron como moles de malvidin-3-pcoumarilglucoside, utilizando $E=30200$.

También se evaluó la capacidad antioxidante a partir del ensayo de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) por el EM.

4.5 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC)

Este procedimiento se realizó previo a todos los cultivos celulares. Se aislaron las PBMC a partir de sangre periférica obtenida según protocolo descrito en 4.1.2. La sangre total fue centrifugada durante 5 minutos a 1500 rpm para retirar el exceso de plaquetas en plasma. Posteriormente fue diluida 1:2 con buffer fosfato salino (PBS) 1X estéril y depositada en tubos de centrifuga Corning® estériles que previamente contenían medio separador de linfocitos (LSM®) cuidando de no mezclar ambas fases. La proporción utilizada fue 4mL de LSM® por cada 5mL de sangre diluida. La separación se hizo por centrifugación durante 25 minutos a 1550 rpm. El anillo de PBMC resultante fue extraído y lavado 2 veces con PBS 1X estéril y una vez con medio RPMI-1640. Se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer y se llevó a la concentración necesaria para cada ensayo, resuspendiendo las células en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero de ternera fetal (STF) (Anexo 8). Todo lo anterior en cabina de flujo laminar para asegurar las condiciones estériles (Figura 13).

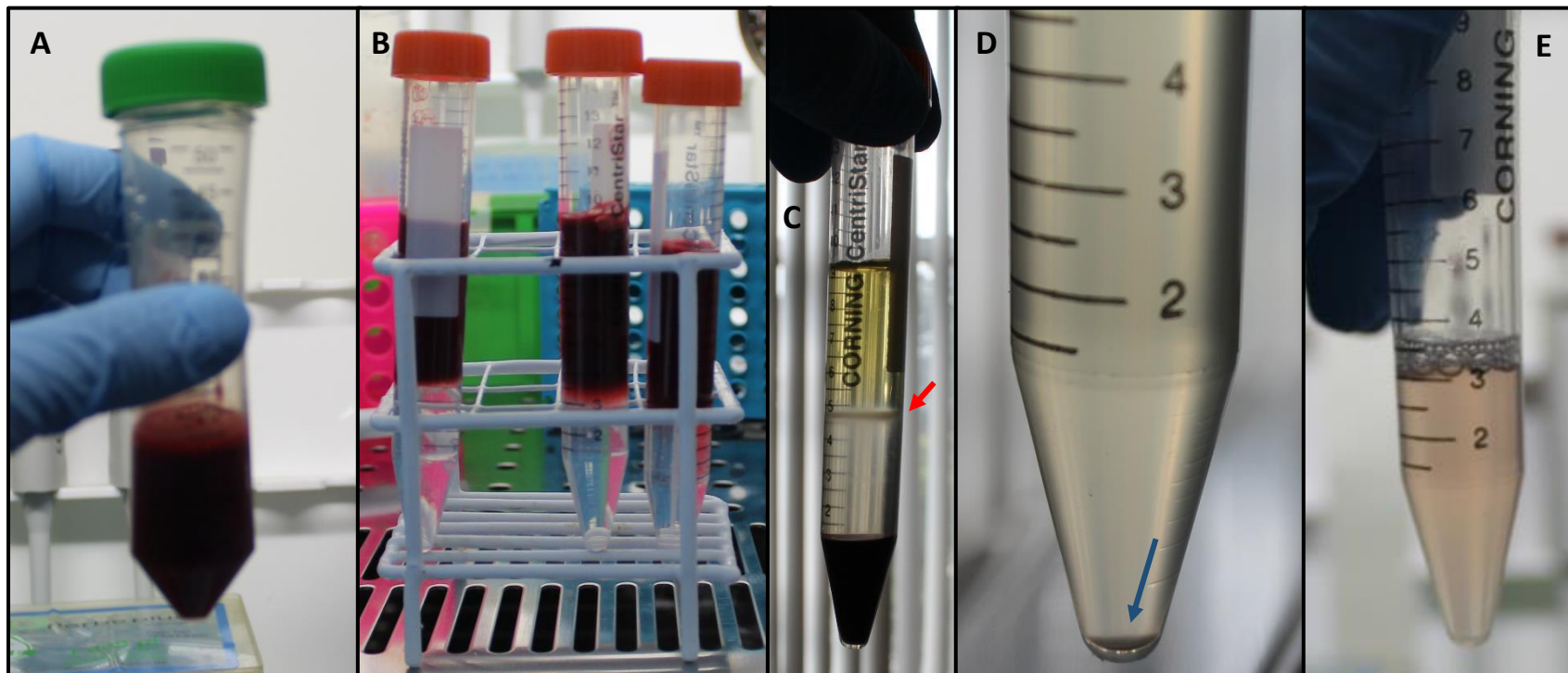


Figura 13. Proceso de aislamiento de PBMC. A. Sangre periférica diluida en PBS 1X estéril. B. Separación por gradiente de densidad: 5mL de sangre diluida sobre 4mL de LSM®. C. Distribución de fases post-centrifugación. De abajo hacia arriba se observan a los eritrocitos + células polimorfonucleares, medio separador LSM®, anillo de PBMC (flecha roja), plasma sanguíneo. D. Lavado de PBMC, nótese el *pellet* de células libre de eritrocitos (flecha azul). E. PBMC resuspendidas en medio RPMI-1640 suplementado.

4.6 Preparación de la solución *stock* de EM

Se preparó una solución *stock* a la concentración de 2 mg/mL, pesando 20 mg y disolviéndolo completamente en 10 mL de medio RPMI-1640. La solución *stock* fue esterilizada filtrándola en membrana Millipore® de 0.2 μ M (Figura 14). Este *stock* fue empleado para preparar las concentraciones a evaluar en cada ensayo.

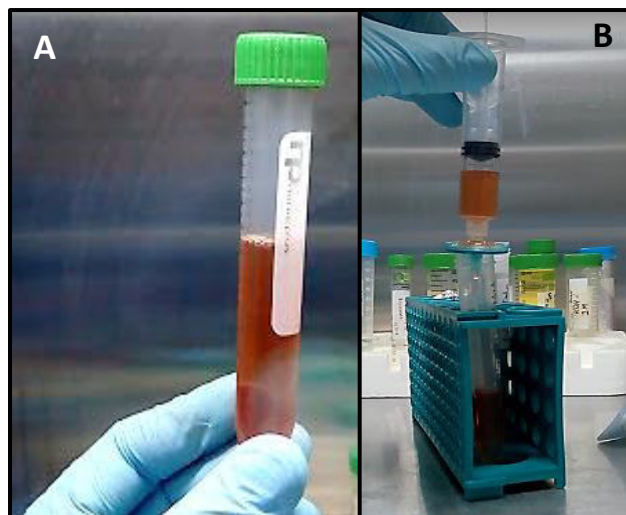


Figura 14. Preparación de solución *stock* de EM. A. Extracto disuelto en RPMI-1640 (2 mg/mL). B. Esterilización de EM a través de filtrado en membrana de 0.2 μ M.

4.7 Evaluación de la viabilidad celular de PBMC cultivados con EM

Esta prueba se basa en la reducción de sales de tetrazolium MTT (metil tiazol tetrazolio) por el metabolismo celular (Mosmann, 1983). Antes de realizar el cultivo celular, el EM fue diluido en medio RPMI-1640 usando 2 como factor de dilución. Las concentraciones finales fueron 5, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 μ g/mL. Se colocaron 100 μ L de la suspensión de células obtenidas en 4.5 con una concentración de 2×10^6 cel/mL sobre 100 μ L de cada concentración de extracto, en microplaca de 96 pocillos, según la distribución mostrada en la Figura 15. Se consideró control positivo al cultivo con fitohemaglutinina comercial (PHA) a una concentración de 10 μ g/mL, y control negativo al cultivo sin extracto. Las células fueron cultivadas durante 48 h en atmósfera de 5% de CO₂, 37°C y 99% de humedad. A las 44 h se añadió 10 μ L del reactivo MTT (5 mg/mL)

(Anexo 2) y se regresó a la incubadora hasta cumplir las 48 h. Posteriormente se eliminaron los sobrenadantes y se añadieron 100 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO) a cada pocillo. El cultivo fue llevado a 37°C con agitación de 80 rpm durante 20 min, para finalmente ser leído en un lector de placas de ELISA, a una longitud de onda de 492 nm. Las pruebas se realizaron por triplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C			CN	5	25	50	100	200	400	800	PHA	
D			CN	5	25	50	100	200	400	800	PHA	
E			CN	5	25	50	100	200	400	800	PHA	
F												
G												
H												

Figura 15. Distribución de tratamientos en microplaca de 96 pocillos para prueba de viabilidad por MTT. Los números indican la concentración en μ g/mL, mientras que CN representa al control negativo.

4.8 Evaluación de la actividad inmunomoduladora del EM de *L. meyerii* sobre PBMC

4.8.1 Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (explosión respiratoria)

Esta prueba se realizó aplicando la prueba de Nitro Blue Tetrazolium (NBT), la cual mide la cantidad de O_2^- intracelular producido por los monocitos mediante la reducción de sales de NBT (Lomonte, 2009). Las PBMC fueron cultivadas tomando 100 μ L de esta suspensión celular (2×10^6 cel/mL) y enfrentándolas con 100 μ L de las soluciones de extracto con las concentraciones de 5, 25, 100, 400 y 800 μ g/mL, en microplacas de 96 pocillos, todo a las mismas condiciones relatadas en 4.7 (Figura 16A). Los controles positivos fueron cultivos de PBMC con PMA (100 ng/mL) y LPS (50 μ g/mL), mientras que el control negativo fue PBMC con medio RPMI-1640. Al pasar 4 h, se retiró 20 μ L de sobrenadante y se adicionó el mismo volumen de reactivo NBT (5

mg/mL) (Anexo 3), llevándose a la incubadora por 2 h más en las mismas condiciones. Al culminar el tiempo indicado, se retiró el sobrenadante de todos los pocillos por inversión rápida y las células adheridas (monocitos) en la placa fueron lavadas dos veces con 100 μ L de PBS 1X estéril (Figura 16B).

Las células fueron fijadas con 80 μ L de metanol QP por pocillo, dejándose hasta su total evaporación.

Finalmente se agregó 120 μ L de KOH 2N y 140 μ L de DMSO para disolver el formazán. Las microplacas fueron incubadas a 37°C, con agitación de 80 rpm durante 10 min en oscuridad. La lectura se realizó a 630 nm de longitud de onda. Todas las pruebas fueron hechas por triplicado.

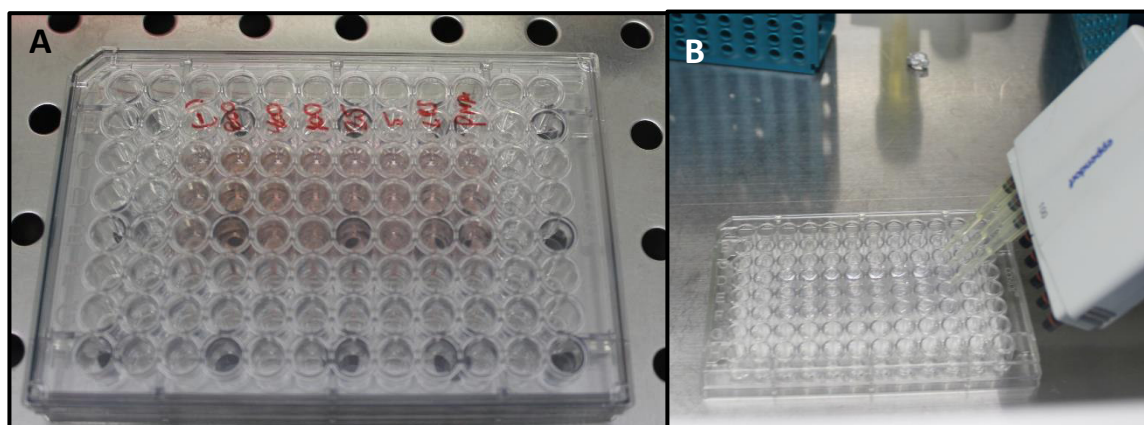


Figura 16. Cultivo celular para prueba de anión superóxido. A. Nótese la distribución de los tratamientos, de izquierda a derecha se tiene al control negativo, EM a 800, 400, 100, 25, 5 μ g/mL, LPS y PMA. **B.** Lavados de células adheridas con PBS 1X.

4.8.2 Determinación de la producción de especies reactivas de nitrógeno (óxido nítrico)

Se realizó un cultivo con 100 μ L de PBMC (concentración final de 1×10^6) sometidas a 100 μ L de EM a 5, 25, 100, 400 y 800 μ g/mL por 18 h a las mismas condiciones expuestas en 4.7, teniendo como control positivo a las células expuestas a LPS comercial (50 ng/mL) y control negativo células con medio RPMI-1640. Pasado dicho tiempo se tomaron 100 μ L de sobrenadante y se incubaron con 50 μ L de reactivo

A (Ácido sulfanílico) durante 10 min en oscuridad; luego se adicionaron 50 μ L del reactivo B (solución de NED) de Peter Griess (Anexo 1) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se midieron las D.O. con una longitud de onda principal de 492 nm y referencial de 630 nm. Cada prueba se realizó por triplicado.

4.9 Evaluación del efecto del EM de *L. meyenii* sobre la producción de TNF- α

4.9.1 Cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC)

Se realizó un cultivo de PBMC enfrentadas con EM de 25 y 800 μ g/mL; dichas concentraciones se eligieron en base a los resultados obtenidos en 4.7 y 4.8.2, eligiendo una concentración alta y baja (25 y 800 μ g/mL). El cultivo se desarrolló durante 18 h en microplacas de 24 pocillos. Los controles fueron PBMC cultivados con PHA (10 μ g/mL), PMA (50 ng/mL) y PMA+PHA (50 ng/mL y 10 μ g/mL, respectivamente) (Sullivan et al., 2000). El control negativo consistió en PBMC con medio de cultivo (Figura 17).

Al finalizar el ensayo, se centrifugaron los sobrenadantes en microtubos de 1.5mL a 1500 rpm durante 10 min a 4°C para separar las células no adherentes. Los sobrenadantes sin células fueron almacenados a -80°C hasta realizar la prueba de ELISA.



Figura 17. Cultivo celular para extracción de RNA y evaluación de TNF- α .

4.9.2 Determinación de la expresión de mRNA de TNF- α

4.9.2.1 Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA se utilizó el kit “innuPREP RNA Mini Kit” de analytik-jena (Figura 18 A y B). Algunos reactivos necesitaron una preparación previa (Anexo 4). Tras el aislamiento de las células no adherentes (4.9.1) se lisaron las células adherentes de cada tratamiento con 400 μ L de la solución de lisis RL distribuidos entre las cuatro repeticiones (100 μ L por pocillo). Se resuspendieron las células adherentes por pipeteo y se dejó incubar por un minuto en la microplaca. Posteriormente se colectó y depositó el lisado en los microtubos con el *pellet* de células no adherentes correspondiente, homogenizando la mezcla por pipeteo e incubando por 1 min adicional. El lisado total fue colocado en el *Spin Filter D* y centrifugado a 11000 g durante 1 min para separar el DNAg. El filtrado se homogenizó con 400 μ L de etanol al 70% y el volumen resultante fue colocado en el *Spin Filter R*. El sistema fue centrifugado de manera similar que el anterior paso, pero esta vez el filtrado fue descartado. Se realizaron dos lavados del RNA en la columna por centrifugación: el primero con 500 μ L y el segundo con 700 μ L de *buffer* de lavado HS y LS, respectivamente. El contenido de RNA fue eluido con 60 μ L de agua libre de nucleasas por centrifugación a 11000 g por 2 min (Figura 19).

El RNA fue cuantificado con el kit de Qubit ® “Qubit RNA HS Assay Kit” y almacenado a -80°C (Figura 18C) hasta la realización de la RT-PCR.

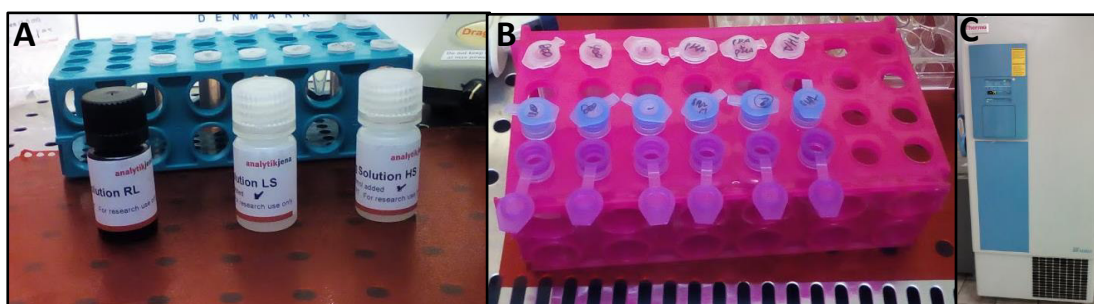


Figura 18. Extracción de RNA. A. Reactivos del kit “innuPREP RNA Mini Kit”. B. Columnas de extracción. Nótese las columnas azules (*Spin Filter D*) y moradas (*Spin Filter R*), utilizadas para aislar DNA y RNA, respectivamente. C. Congelador de almacenamiento a -80°C, utilizada para almacenamiento de RNA y sobrenadantes.

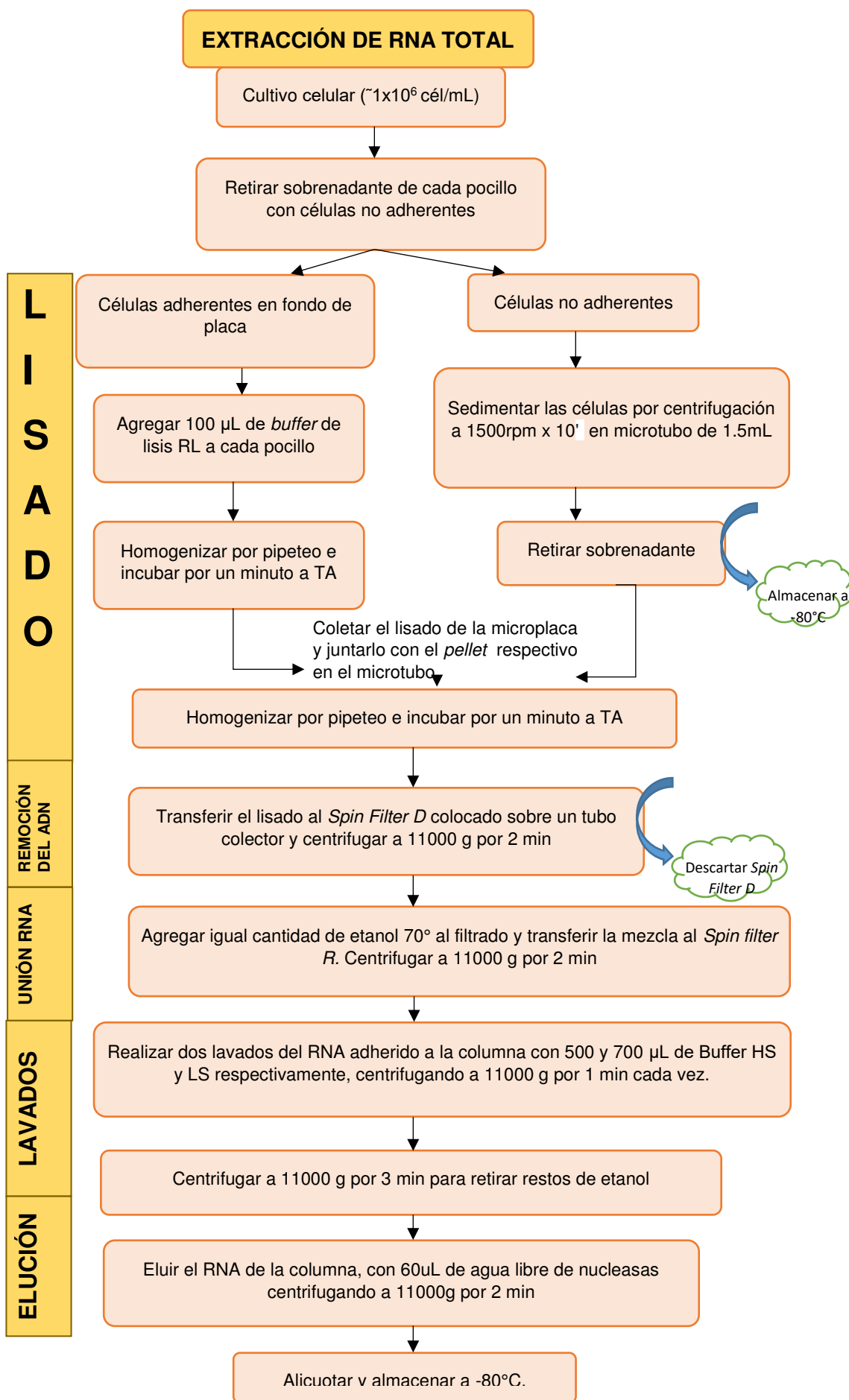


Figura 19. Flujograma para la extracción de RNA total. Se utilizó el “innuPREP RNA Mini Kit” de analytik-jena, el cual extrae RNA en columna de sílice, tras una remoción selectiva del DNAG también en columna.

4.9.2.2 Síntesis de cDNA (RT-PCR)

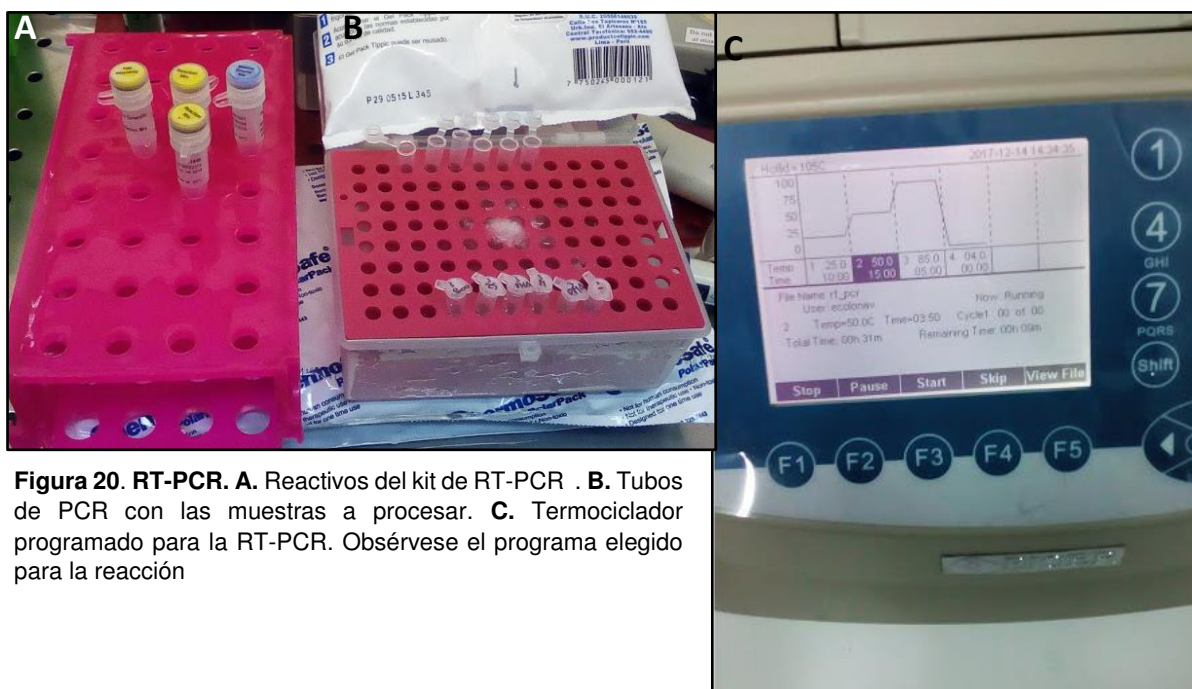
Para la transcripción reversa del RNA total se utilizó el kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR* (#K1649, Thermo Scientific) (Figura 20A) siguiendo las especificaciones del fabricante. El RNA fue predenaturado a 65°C durante 5 min previo a la preparación del mix de reacción. En un tubo de PCR estéril y libre de nucleasas se coloraron 4 µL de *5X mix reaction*, 2 µL de *Maxima enzyme mix*, 3 µL de RNA molde (aproximadamente 100ng/mL) y 11 µL de agua libre de nucleasas, en el orden que se indica en la Tabla 3 (Figura 20B). La reacción de síntesis de cDNA se realizó en un termociclador *Bioer Technology* (versión 2009-1.6), siguiendo el programa expuesto en la Tabla 4 (Figura 20C). El cDNA obtenido fue alicuotado y su integridad se evaluó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.7% en TAE 1x (ANEXO 5). El cDNA fue cuantificado con el kit de Qubit® “Qubit dsDNA HS Assay Kit”.

Tabla 3. Preparación de mix de reacción para síntesis de cDNA

Orden	Reactivo	Volumen
1°	5X Reaction mix	4µL
2°	Maxima Enzyme mix	2µL
3°	RNA molde	3µL
4°	Agua libre de nucleasas	11µL
Total		20µL

Tabla 4. Programa en termociclador para la síntesis de cDNA

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Primera extensión	25	10
Síntesis de cDNA	50	15
Reacción de terminación	85	5
Hold	4	∞



4.9.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional

Los *primers* para los genes TNF- α y GAPDH fueron elegidos por búsqueda bibliográfica (Anexo 6) y evaluados con los servidores Primer BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) y Oligocalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

Para las PCR se utilizó el *PCR Platinum Super Mix* (Invitrogen) siguiendo las proporciones recomendadas por el fabricante pero modificando los volúmenes: se colocaron 17 μ L de *Platinum Master Mix*, 1 μ L del *primer Forward* (0.5 μ M), 1 μ L *primer Reverse* (0.5 μ M), 1 μ L cDNA (aproximadamente 50 ng/ μ L) (Figura 21A). Para el control de la reacción, se utilizó 1 μ L de agua libre de nucleasas. Las amplificaciones se llevaron a cabo por 27 ciclos de los pasos 2, 3 y 4 (Tabla 5, Figura 21B).

Tabla 5. Programa en termociclador para PCR convencional

#	Paso	TNF- α		GAPDH	
		Temperatura (°C)	Tiempo	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Denaturación inicial	94	5 minutos	94	5 minutos
2	Denaturación	94	30 segundos	94	30 segundos
3	Hibridación	60	30 segundos	57	30 segundos
4	Extensión	72	45 segundos	72	45 segundos
5	Extensión final	72	7 minutos	72	7 minutos

4.9.2.4 Electroforesis en gel de agarosa

Los amplicones resultantes fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% empleando *buffer* TBE 1X (Anexo 5) (Figura 21D). La corrida electroforética se realizó a 100V durante 60 min. Se emplearon el *fluorescent DNA loading dye* (GeneON GmbH) (Figura 21C) y SYBR Green como colorantes y las bandas se visualizaron en un fotodocumentador (Enduro™ GDS, Labnet). Se utilizó el *ladder* Perfect DNA™ Markers, 0.05-10 kbp (Novagen) para identificar la longitud de los amplicones. Las corridas se realizaron por triplicado.

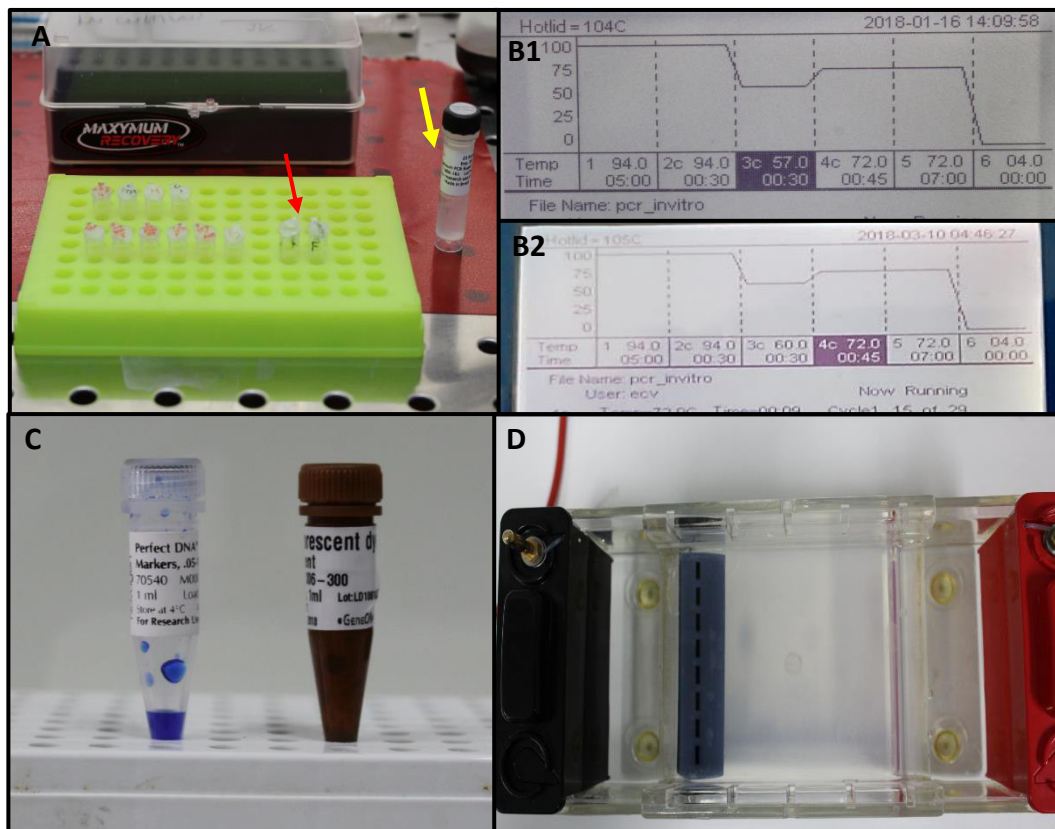


Figura 21. Análisis de expresión génica por PCR convencional. A. Preparación de mezclas para PCR convencional. Nótese los *primers* (flecha roja) y el SuperMix (flecha amarilla). Programa de amplificación en termociclador, en B1 se observa el programa para el gen constitutivo, mientras que en B2 el programa de amplificación para TNF- α . C. *Ladder* y *dye* utilizado en electroforesis. D. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE1X.

4.9.2.5 Análisis por cuantificación densiométrica

Las bandas resultantes fueron fotografiadas con la cámara incorporada en el fotodocumentador para la cuantificación densiométrica, la cual se realizó utilizando el software ImageJ (NIH, USA) (Figura 22). Se halló la relación entre la densidad de mRNA de TNF- α y la densidad de mRNA del gen constitutivo GAPDH para cada tratamiento y control.

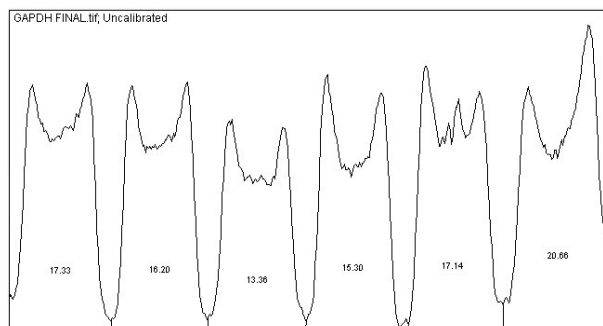


Figura 22. Cuantificación densiométrica. Se puede observar el *ploteo* realizado al gel de electroforesis. Cada pico representa una banda.

4.9.3 Determinación de TNF- α secretado por PBMC

La identificación de la citoquina secretada se realizó mediante la prueba de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) tipo sándwich, para lo cual se utilizó el kit *Human Tumor Necrosis Factor α ELISA Kit* (RAB0476, Sigma-aldrich), siguiendo las recomendaciones de manufactura (Figura 23A). Previo al inicio del protocolo, todos los reactivos fueron llevados a TA y se prepararon los reactivos que lo necesitaron, según certificado de análisis (Anexo 7, Figura 23B).

Se colocaron 100 μ L del sobrenadante obtenido en 4.9.1 en los pocillos provistos en el kit, para cubrirlos e incubarlos durante 2.5 h a TA con agitación constante de 60 rpm. Pasado dicho tiempo, se descartó la solución y los pocillos fueron lavados 4 veces con 300 μ L de *Wash Buffer* 1X, como se muestra en la Figura 23C; se debe procurar no dejar restos de *buffer* tras el último lavado.

Para la detección del antígeno (TNF- α), se agregaron 100 μ L del anticuerpo de detección biotinilado 1X a cada pocillo y se llevó a incubar por 1 h a TA con agitación

constante de 60 rpm. Después de este tiempo, se descartó el contenido de cada pocillo y se repitieron los lavados.

Para la formación del complejo biotina-estreptavidina, se agregaron 100 μ L de HRP-estreptavidina a cada pocillo y se llevó a incubar por 45 min a las mismas condiciones que las anteriores veces. De igual manera, se descartó el contenido y se lavaron los pocillos 4 veces, de manera similar a lo realizado anteriormente.

Para la reacción colorimétrica, se añadieron 100 μ L del reactivo TMB a cada pocillo. El tiempo de incubación esta vez fue de 30 min y en oscuridad, resultando en una coloración azul, tal como se muestra en la Figura 23D. Finalmente, se agregó 50 μ L de la solución de *stop* y se leyó en una lectora de placas de ELISA a 450nm. La Figura 24 muestra el protocolo seguido para este ensayo. Todos los tratamientos y controles se hicieron por triplicado. La concentración de TNF- α se halló a partir de las D.O. a través de la curva estándar elaborada con una proteína recombinante (Anexo 7E).

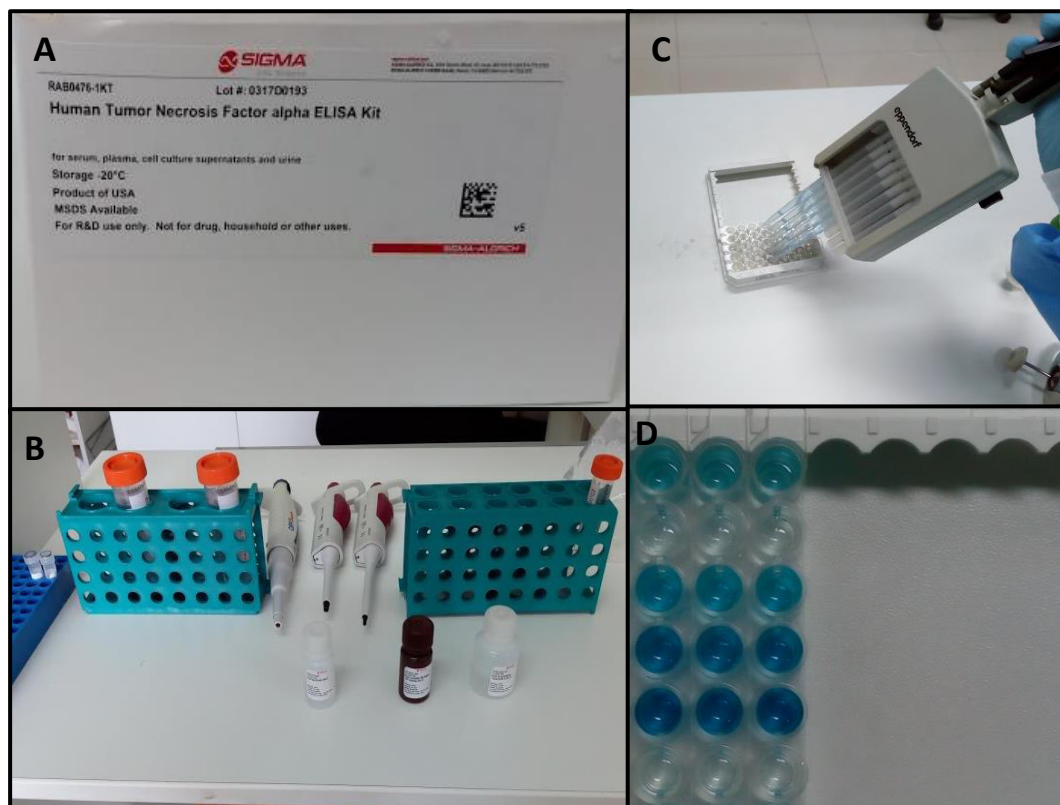


Figura 23. ELISA para identificación de TNF- α secretado por PBMC A. Kit empleado para la prueba de ELISA. B. Reactivos *ready-to-use*. C. Lavados de pocillos post-incubación. D. A la izquierda se muestran los pocillos con el reactivo colorimétrico TMB oxidado (azul), producto de la reacción con HRP. Esta reacción pone en evidencia la presencia del antígeno (TNF- α).

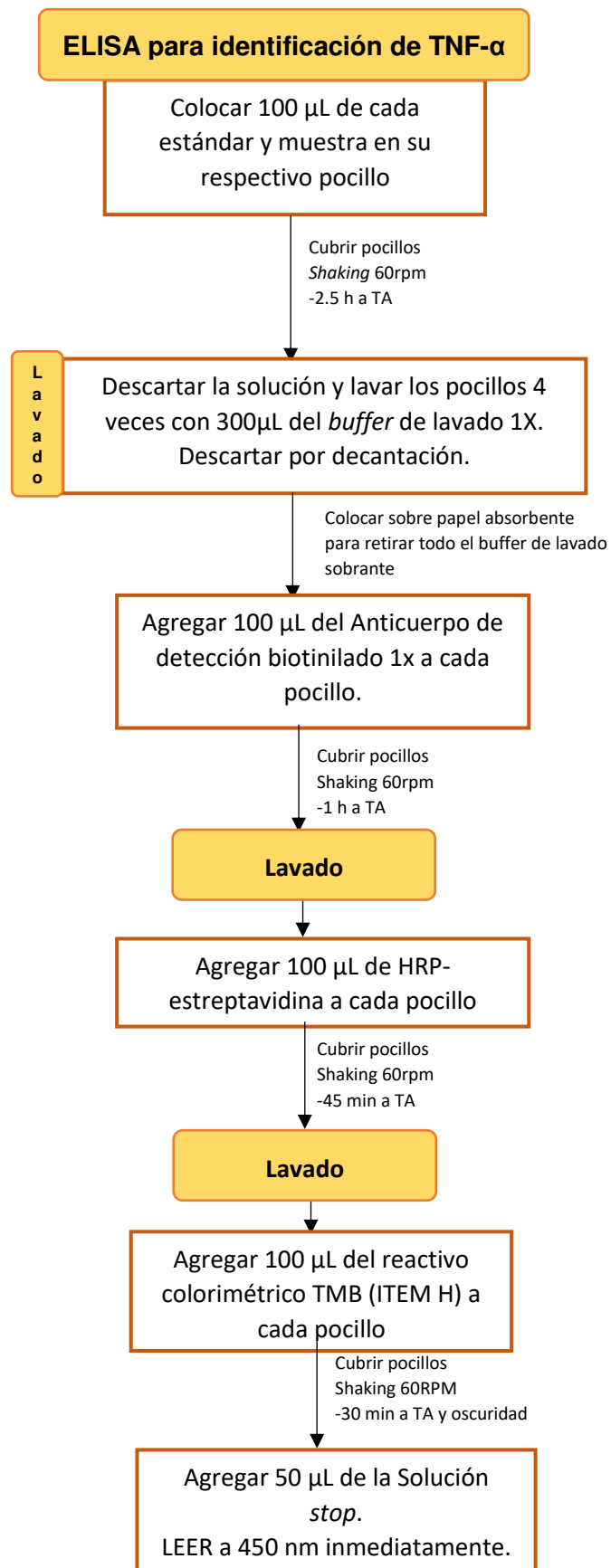


Figura 24. Flujograma de ELISA para identificación de TNF- α secretado por PBMC.

4.10 Análisis estadístico

Los datos de cada ensayo fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), ya que éste permite analizar el efecto de variables categóricas (tratamientos) sobre una característica, propiedad o cualidad cuantificable de determinadas unidades experimentales y demostrar si existe diferencia entre los grupos. Se realizó una prueba *a posteriori*, denominada test de Dunnett, para poder comparar los grupos experimentales con un control. Para tales fines, se utilizó el software GraphPad Prism 7.02, realizando ANOVA con los test de Dunnet. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

5.1 Obtención de extracto metanólico de *Lepidium meyenii* (ecotipo morado)

Se consiguió obtener el EM, el cual se caracterizó por sus propiedades organolépticas, con un color similar al del chocolate, brillo y fuerte olor. Se logró extraer un total de 4,0789 g, lo que se tradujo en un rendimiento de 8.16%, tomando en cuenta la masa total de harina de maca inicial (50 g).

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{4.0789}{50} \times 100$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = 8.1578$$

5.2 Determinación de la composición fitoquímica y capacidad antioxidante

La Tabla 6 muestra los resultados de la marcha fitoquímica realizada. Los polifenoles, flavonoides y antocianinas fueron expresados como ácido gálico, rutina y malvidin-3-pcoumarilglucoside respectivamente. Además, se registró una alta capacidad antioxidante (90.29%), evidenciado por la inhibición del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

Tabla 6. Resultados de análisis fitoquímico realizado

Metabolito	Cantidad	expresión como
Polifenoles	114.803mg/gEM*	Ácido gálico
Flavonoides	75.9mg/gEM*	Rutina
Antocianinas	2.49x10 ⁻³ moles/gEM*	Malvidin-3-pcoumarilglucoside
Capacidad antioxidante	90.299%	Inhibición de DPPH

*gEM : gramo de extracto metanólico

5.3 Evaluación de la viabilidad de PBMC cultivadas con EM

Se realizaron las pruebas de viabilidad por triplicado para cada tratamiento (Figura 25). Los resultados se aprecian en la Tabla 7 y Figura 26. La variación entre repeticiones fue mínima. Con respecto al control negativo, se ve un aumento significativo ($p<0.05$) en las células expuestas al PHA y al EM de concentración 25 $\mu\text{g/mL}$. En los demás tratamientos, la viabilidad no fue afectada ($p>0.05$), indicándose de esta manera que las concentraciones de EM evaluadas no presentaron efecto citotóxico.

Tabla 7. Prueba de viabilidad por el método de MTT en células mononucleares de sangre periférica humana. Se probaron siete concentraciones del extracto metanólico de *L. meyenii* (ecotipo morado). Se encontró una estimulación significativa de PBMC por EM25 (25 $\mu\text{g/mL}$) ($p<0.05$), al igual que las células tratadas con fitohemaglutinina.

Tratamiento	DENSIDAD ÓPTICA				p<0.05
	R1	R2	R3	Media \pm SD*	
EM5	0.1220	0.1390	0.1440	0.1350 \pm 0.0115	NO
EM25	0.2360	0.2460	0.2330	0.2380 \pm 0.0068	SI
EM50	0.1920	0.1640	0.1530	0.1697 \pm 0.0201	NO
EM100	0.1880	0.1690	0.1680	0.1750 \pm 0.0113	NO
EM200	0.1490	0.1490	0.1680	0.1553 \pm 0.0109	NO
EM400	0.1300	0.1430	0.1510	0.1413 \pm 0.0106	NO
EM800	0.1640	0.1660	0.1660	0.1653 \pm 0.0012	NO
Control -	0.1900	0.1640	0.1200	0.1580 \pm 0.0354	NO
PHA	0.2110	0.2270	0.2150	0.2177 \pm 0.0083	SI

*SD: Desviación estándar

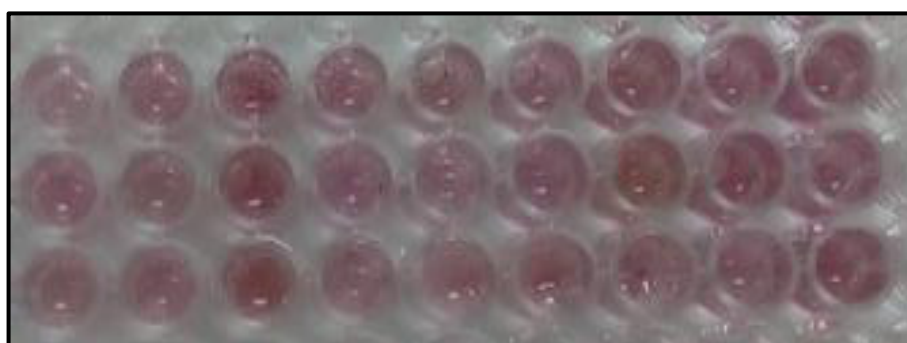


Figura 25. Ensayo de viabilidad por MTT en PBMC. Obsérvese el color púrpura propio del formazán reducido disuelto en DMSO. Cada columna representa un tratamiento, con sus tres repeticiones respectivas

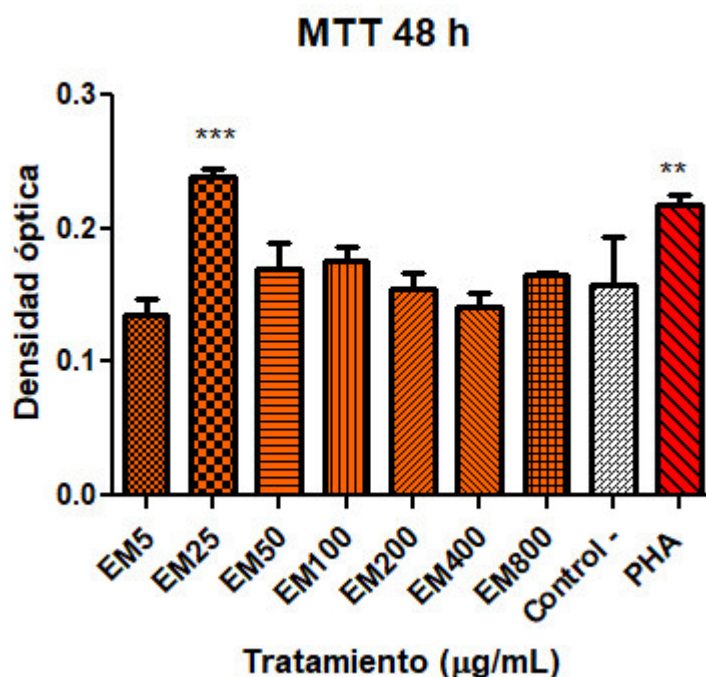


Figura 26. Ensayo de viabilidad de PBMC en presencia de extracto metanólico de maca morada. Las barras representan la media + desviación estándar. Se encontraron diferencias significativas en las células tratadas con EM 25µg/mL (***) y similar a las tratadas con fitohemaglutinina(**), respecto al control ($p < 0.05$). Los demás tratamientos no mostraron variación significativa.

5.4 Evaluación de la actividad inmunomoduladora del EM de *L. meyenii* sobre PBMC

5.4.1 Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (explosión respiratoria)

La prueba fue realizada tomando las concentraciones expuestas en la Figura 28. Las PBMC tratadas con EM no mostraron diferencias significativas respecto al control negativo; sin embargo, el grupo de EM a 5 µg/mL mostró una elevación en la producción de anión superóxido *in vitro* (Figura 27B, 28, Tabla 8). El test de Tukey tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos evaluados. No se observa tendencia alguna que sugiera relación dosis-dependiente. El PMA, al ser un potente activador celular, estimuló significativamente la producción de EROs por PBMC.

Tabla 8. Evaluación de la producción de EROs (explosión respiratoria) por PBMC. No se observaron diferencias significativas entre el control negativo y los tratamientos con extracto ni con LPS. La activación de PBMC por PMA reflejó una variación significativa ($p<0.05$) respecto a las células sin tratamiento.

Tratamiento	DENSIDAD ÓPTICA				p<0.05
	R1	R2	R3	Media \pm SD*	
EM5	0.4420	0.3210	0.3530	0.3720\pm0.0627	NO
EM25	0.2500	0.2950	0.2290	0.2580\pm0.0337	NO
EM100	0.3050	0.3010	0.2430	0.2830\pm0.0347	NO
EM400	0.2740	0.2510	0.2740	0.2663\pm0.0133	NO
EM800	0.2750	0.2650	0.1980	0.2460\pm0.0419	NO
Control -	0.3110	0.2740	0.2390	0.2747\pm0.0360	
LPS	0.3650	0.3170	0.3300	0.3373\pm0.0248	NO
PMA	0.5440	0.6450	0.4340	0.5410\pm0.1055	SI

*SD: Desviación estándar

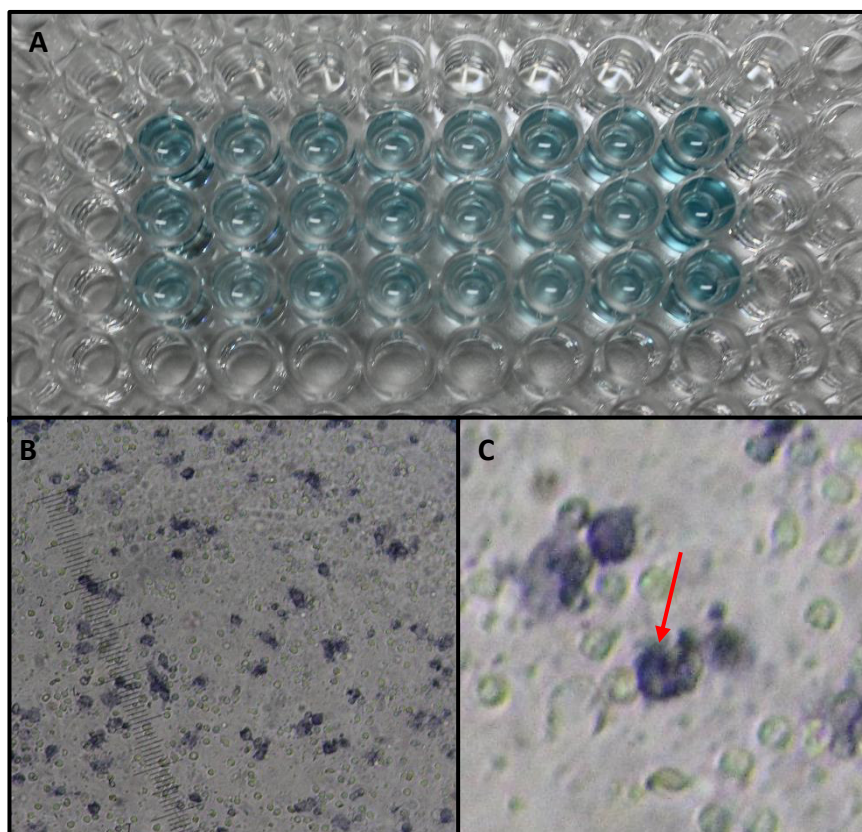


Figura 27. Evaluación de producción de EROs en PBMC. A. Microplaca de cultivo con el formazán disuelto por KOH y DMSO. B. Células mononucleares de sangre periférica humana tras estimulación con EM5 que muestran los cristales de formazán en su citoplasma. C. La flecha roja muestra el NBT convertido a cristales de formazán dentro de PBMC, producto de la acción reductora del anión superóxido.

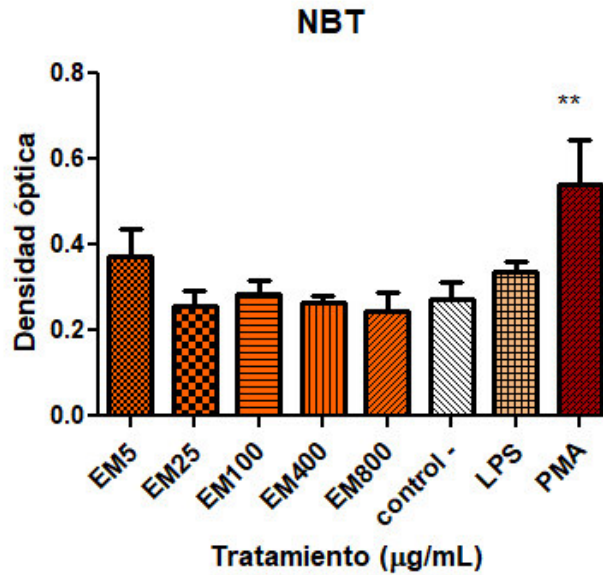


Figura 28. Evaluación de la producción de EROs (explosión respiratoria) por PBMC. Las barras representan la media + desviación estándar. Se encontraron diferencias significativas en las células tratadas con PMA (***) ($p < 0.05$), mas no en las que fueron estimuladas con EM, sin embargo, se apreció una elevación no significativa en EM5 y LPS. El test de Tukey tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos evaluados.

5.4.2 Determinación de la producción de óxido nítrico (NO) por PBMC

La prueba fue realizada evaluando las mismas concentraciones de EM que para la producción de EROs. Los resultados mostraron una estimulación de la producción de NO dosis-dependiente, observándose una diferencia significativa ($p < 0.05$) en las células tratadas con 400 y 800 µg/mL de EM. Los demás tratamientos no mostraron diferencias significativas, con respecto al control negativo (Figura 30 y Tabla 8). Estos resultados indican que EM400 y EM800 activan la producción de $\text{TNF-}\alpha$ y probablemente otras citoquinas proinflamatorias.

Tabla 9. Determinación de la producción de NO por PBMC a través de la prueba de Peter Griess. Se observó un incremento significativo de la producción de NO en las células tratadas con EM de maca morada a 400 y 800 µg/mL en relación al control, sugiriendo una tendencia dosis-dependiente ($p < 0.05$).

Tratamiento	DENSIDAD ÓPTICA				p<0.05
	R1	R2	R3	Media \pm SD*	
EM5	0.0840	0.0850	0.0850	0.0847\pm0.0006	NO
EM25	0.0770	0.0810	0.0840	0.0807\pm0.0035	NO
EM100	0.0830	0.0850	0.0820	0.0833\pm0.0015	NO
EM400	0.0880	0.0910	0.0990	0.0927\pm0.0057	SI
EM800	0.0940	0.0990	0.0920	0.0950\pm0.0036	SI
Control-	0.0810	0.0820	0.0790	0.0807\pm0.0015	NO
LPS	0.0820	0.0810	0.0770	0.0800\pm0.0026	NO

*SD: Desviación estándar

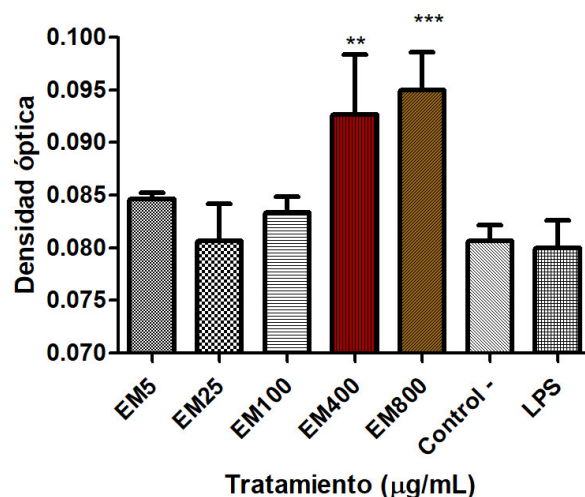


Figura 29. Ensayo de Peter Griess para la determinación de NO. Las barras representan la media + desviación estándar. El NO fue cuantificado en el sobrenadante de los cultivos. Nótese el incremento significativo de la producción de NO en las CMSPH estimuladas con EM a 400 (**) y 800 (***) µg/mL ($p < 0.05$).

5.5 Evaluación de la producción de TNF- α

5.5.1 Cultivo de PBMC

Las PBMC tratadas con EM 25 y 800 $\mu\text{g/mL}$ no formaron “rosetas”, lo que descartó un posible efecto mitótico de este extracto. Se pudieron observar “rosetas” en los tratamientos con PHA y PMA, las cuales se traducen como consecuencia de la expansión clonal. Se pudo observar una mayor cantidad y consistencia visible de rosetas en las células estimuladas con PHA+PMA, tal como se muestra en la Figura 30D, que indica una potente activación y estimulación de la proliferación de PBMC.

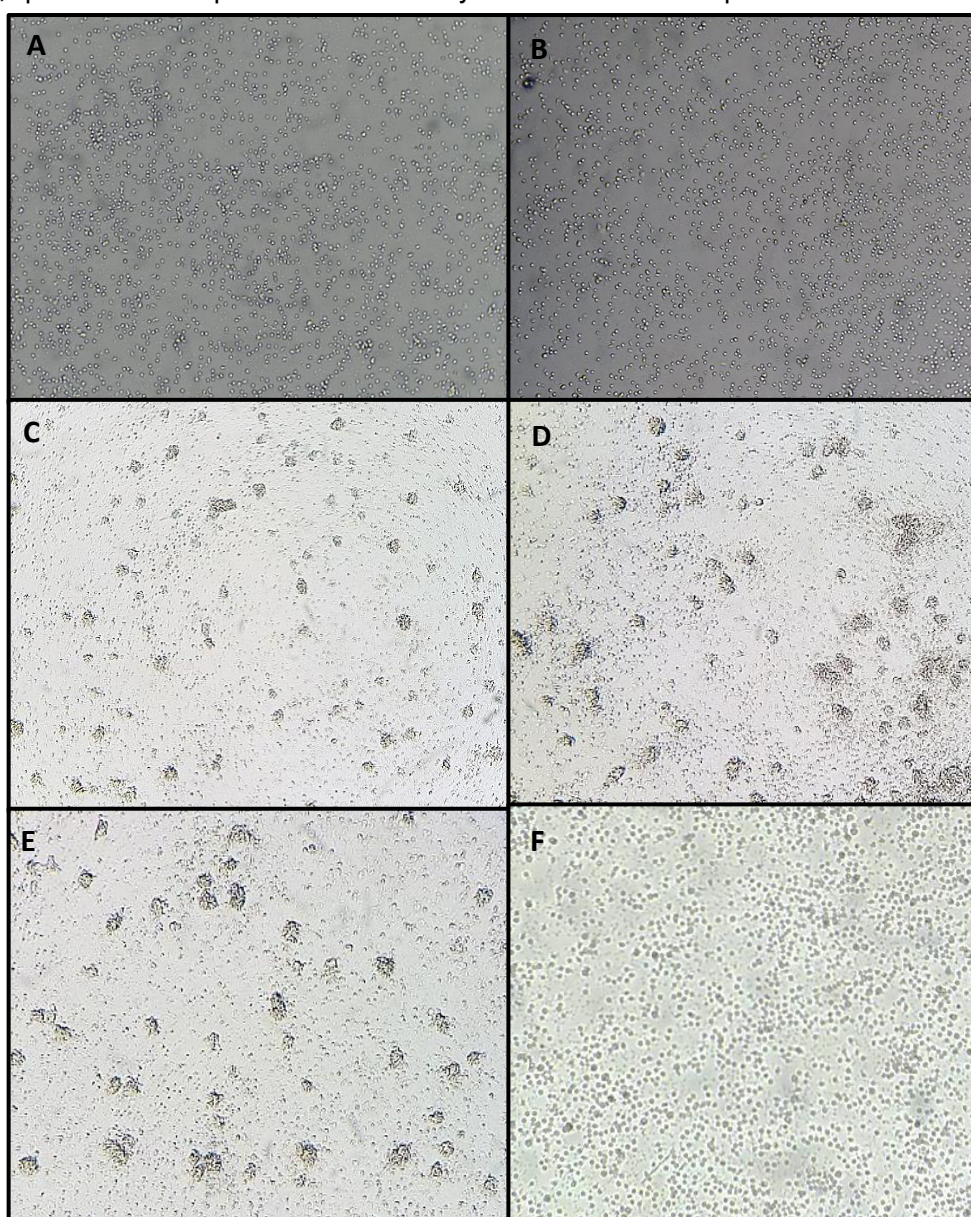


Figura 30. Cultivo de PBMC. Células expuestas a **A.** EM 800 $\mu\text{g/mL}$, **B.** 25 $\mu\text{g/mL}$, **C.** PHA, **D.** PHA+PMA, **E.** PMA y **F.** Células sin tratamiento. Obsérvese las “rosetas” producto de la expansión clonal.

5.5.2 Determinación de la expresión génica de la citoquina TNF- α

El resultado de la expresión de mRNA para el gen constitutivo y TNF- α se muestra en la Figura 31. Después de 18 h de cultivo, se pudo observar una estimulación en la expresión génica de TNF- α por las PBMC tratadas con EM25 y EM800, al compararse con el control negativo; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0.05$). Las células estimuladas con PMA+PHA produjeron una mayor cantidad de mRNA de TNF- α que las PBMC estimuladas con PMA y PHA independientemente. La expresión de TNF- α se incrementó significativamente en los tres grupos tratados con PMA y PHA ($p<0.05$), en relación al control.

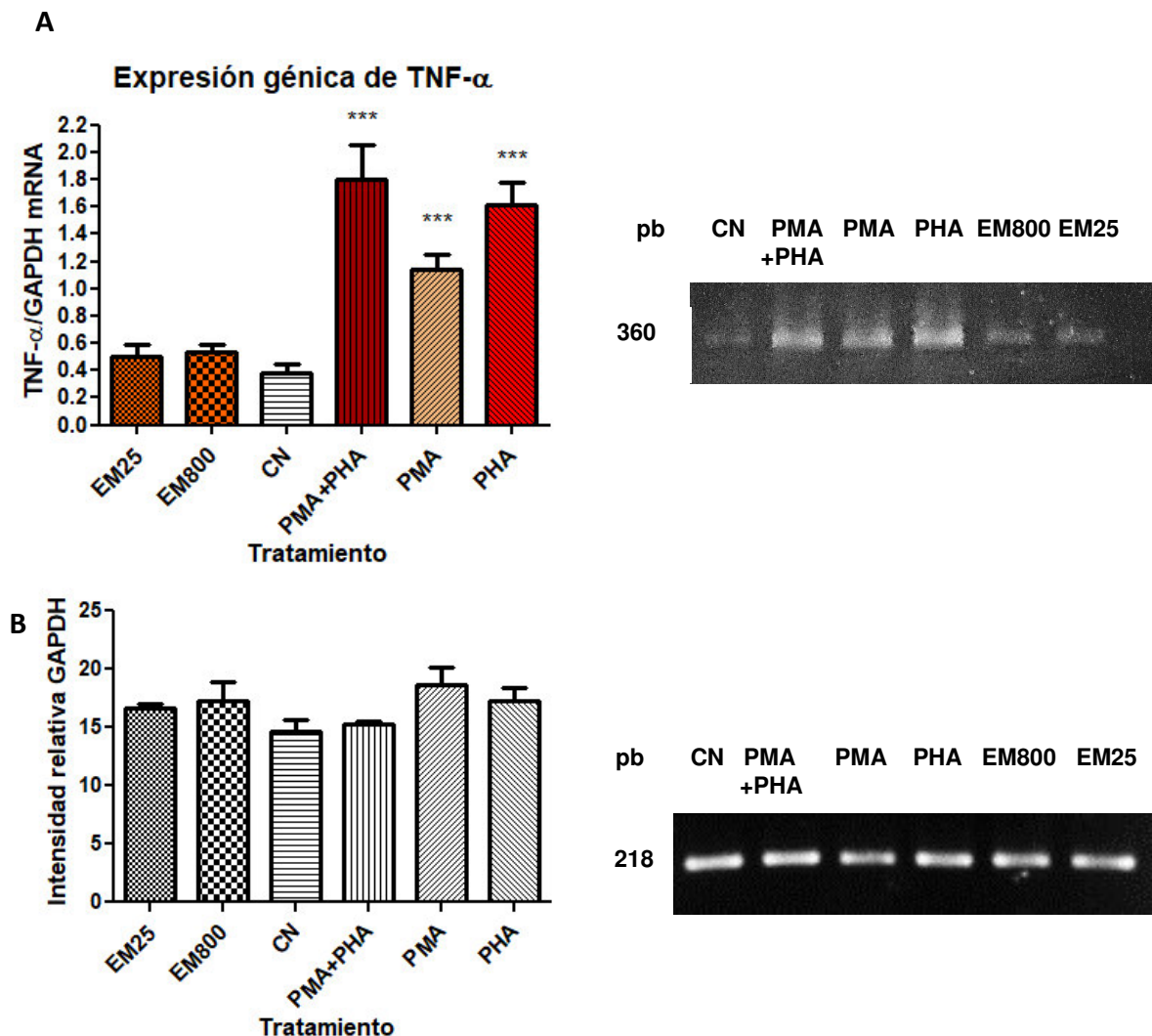


Figura 31. Expresión génica de la citoquina proinflamatoria TNF- α por PBMC a 18 h de cultivo
A. Se observó una estimulación significativa en la expresión génica de TNF- α por PBMC tratadas con PMA y PHA, siendo las células estimuladas con ambos compuestos las que presentaron la mayor cantidad de mRNA ($p < 0.05$). Las células tratadas con EM800 y EM25 también evidenciaron una estimulación en la expresión de la citoquina, sin embargo el incremento no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$). **B.** Intensidades relativas de las bandas obtenidas tras la amplificación del gen constitutivo. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos, lo que indica que la expresión fue constante en los grupos estudiados. CN: Control negativo.

5.5.3 Determinación de TNF- α secretado por PBMC

La cuantificación de la citoquina proinflamatoria TNF- α se realizó a través de la prueba de ELISA tipo sándwich, a partir de una curva estándar hecha con una proteína TNF- α recombinante (Anexo7E). Las PBMC cultivadas con EM25 no indujeron la producción de cantidades significativas de TNF- α ($p>0.05$); sin embargo, EM800 si estimuló significativamente la secreción de esta citoquina al compararse con el control negativo, registrándose una media de 3210 pg/mL. Estos datos sugieren una respuesta dosis-dependiente de las células al EM, observándose una potente estimulación a una alta concentración. Las células estimuladas con PMA y PHA (en conjunto e independientemente) incrementaron significativamente, y en mayor medida, la producción de TNF- α , en relación al control negativo ($p<0.05$) llegando a secretar entre 6971 y 7953 pg/mL en promedio (Tabla 10). Los resultados se muestran en la Tabla 10 y Figura 33. La Figura 32 muestra la coloración obtenida tras la reacción colorimétrica de ELISA.

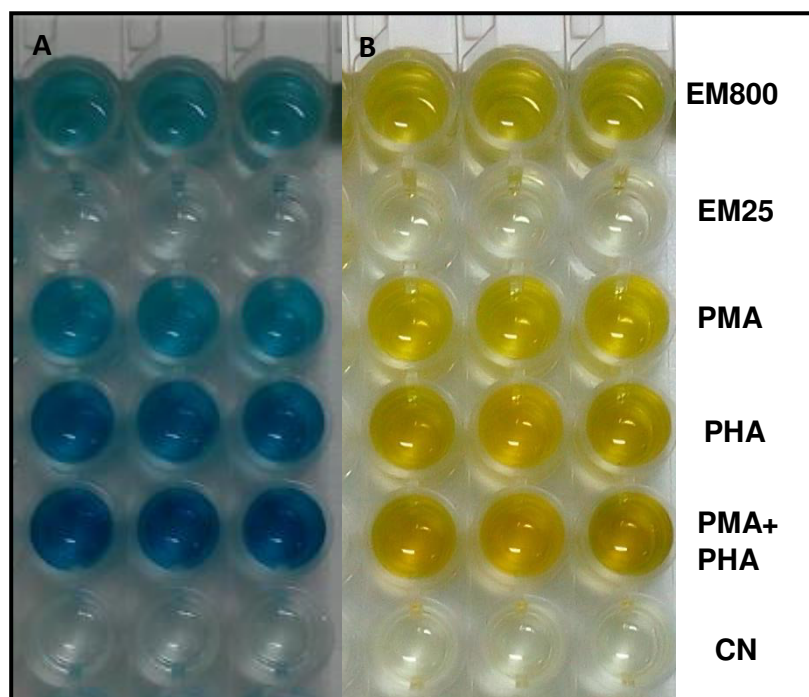


Figura 32. Prueba de ELISA para detección de TNF- α secretado por PBMC. En A y B se observa a los pocillos tras agregarse el reactivo colorimétrico TMB y el reactivo *stop*, respectivamente. Nótese la distribución de los tratamientos, donde se observa la fuerte coloración en los pocillos correspondientes a los tratamientos con PMA, PHA y EM800, indicando reacción positiva. Los pocillos del control negativo y EM25 no presentaron una coloración perceptible.

Tabla 10. Prueba de ELISA para cuantificación de TNF- α secretado por PBMC. Las células estimuladas con EM800 secretaron mayor cantidad de la citoquina en estudio, en comparación al control negativo ($p<0.05$). La mayor producción de TNF- α fue registrado en las células que fueron estimuladas con PHA y PMA. EM25 no estimuló de manera significativa la producción de TNF- α .

Tratamiento	Concentración (pg/mL)				p<0.05
	R1	R2	R3	Media \pm SD*	
EM25	443.33	496.67	426.67	455.6 \pm 36.57	NO
EM800	3300	3080	3250	3210 \pm 115.3	SI
Control -	353.33	390	323.33	355.6 \pm 33.39	NO
PMA+PHA	7236.67	7243.33	7370	7283 \pm 75.13	SI
PMA	7093.33	6896.67	6923.33	6971 \pm 106.7	SI
PHA	8400	7730	7730	7953 \pm 386.8	SI

*SD: Desviación estándar

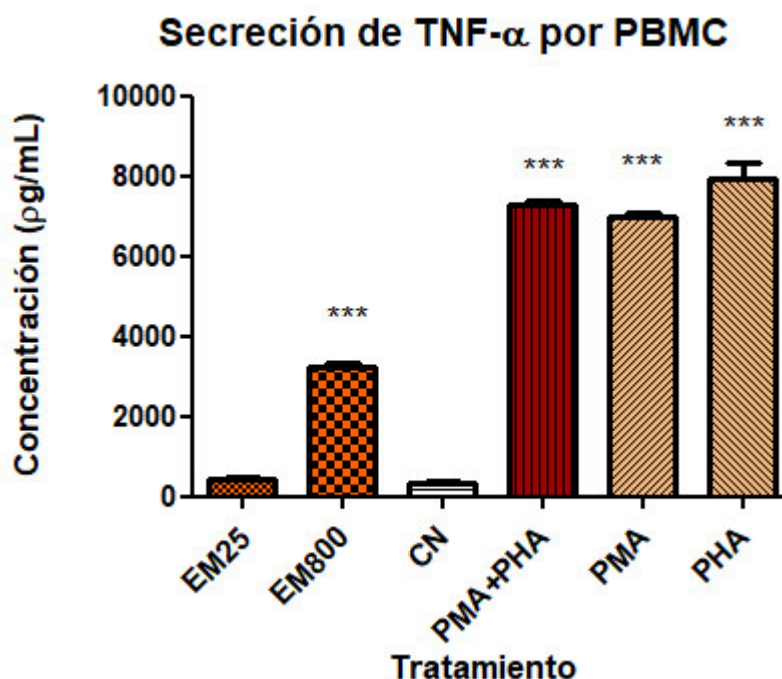


Figura 33. Secreción de TNF- α por células mononucleares de sangre periférica humana. Las barras representan la media + desviación estándar. La citoquina proinflamatoria TNF- α fue cuantificada a través de la prueba de ELISA, previa preparación de una curva estándar. Las células tratadas con 800 μ g/mL (***) de EM incrementaron la producción de TNF- α en comparación al control ($p<0.05$); sin embargo, la cantidad de proteína secretada fue menor a la producida por las células estimuladas con PHA y PMA. EM25 no estimuló la secreción del factor de necrosis tumoral alfa, lo que sugiere una respuesta dosis dependiente.

VI. DISCUSIÓN

La cantidad de compuestos fenólicos, como polifenoles, antocianinas y flavonoides fue significativa en el EM. Se logró cuantificar 1148.02 mg de polifenoles expresados como ácido gálico, por cada 10g de EM. Los niveles de antocianinas también fueron considerables, pudiéndose cuantificar 2.49×10^{-3} moles expresados como malvidin-3-pcoumarilglucoside, por cada gramo de EM. Estos resultados concuerdan con lo reportado por diversos autores (Marin-Bravo, 2003; Palma-Gutiérrez et al., 2012; Gonzales et al., 2014; Sifuentes-Penagos et al., 2015). Shimabuku (2017) reportó una producción diferencial de antocianinas entre ecotipos del mismo color, verificada por cromatografía en papel. Se espera que la cantidad de antocianinas varíe entre ecotipos y el lugar de procedencia, ya que su acumulación es influenciada por las diferencias en temperatura y radiación UV a la que son expuestas (Fernandes de Oliveira et al., 2015).

Los flavonoides son compuestos fenólicos que destacan por su gran actividad antioxidante adquirida gracias a su estructura química (número variable de grupos hidroxilo y propiedades quelantes de metales de transición). *In vivo* protegen a las plantas de agentes oxidantes como la radiación UV, sustancias químicas volátiles, entre otras (Martínez-Flórez et al., 2002). Diversos autores han reportado la presencia de estos metabolitos en extractos de *Lepidium meyenii* (Yllescas (1994), Álvarez (2008), Torres (2008). Respecto a la muestra en estudio, tal como se presenta en la Tabla 6, se obtuvo 7,9mg de flavonoides expresados en rutina, por cada gramo de EM. Esto supera largamente a lo obtenido por Álvarez (2008) para el mismo ecotipo (2.2 mg/100g de EM). Asimismo, esa cantidad fue mayor que la encontrada en los ecotipos blanco, rojo y negro. Shimabukuro (2017) realizó un análisis respecto a la composición diferencial de metabolitos secundarios entre ecotipos y lugares de procedencia, encontrado que la presencia de flavonoides no fue constante, sin embargo, en el ecotipo morado se observó mayor presencia de este metabolito. Zhao et al. (2012) realizaron un estudio

similar, demostrando la influencia del suelo de cultivo en la composición fitoquímica. Por otro lado, Palma-Gutiérrez et al. (2012) encontraron variaciones en la composición fitoquímica de la maca, la misma que obedece a la procedencia de los hipocótilos. Esto podría explicar parcialmente las diferencias encontradas en el presente trabajo y los expuestos por Álvarez (2008), ya que los ejemplares utilizados en ese estudio provinieron de Huancavelica, a diferencia a los utilizados en la presente investigación (Carhuamayo, Junín). Además, se debe tomar en cuenta que la metodología empleada en ambos estudios fue diferente.

La presencia de alcaloides en el EM ha sido reportada por Alzamora (2003), Torres (2008) y Shimabuku (2017). Dichos investigadores obtuvieron fracciones alcaloidales de maca a partir del procesamiento de extracto metanólico y clorofórmico (que requiere de una primera extracción metanólica). Aunque no se haya podido identificar, debido a que se ha seguido la misma metodología para la elaboración del EM, se deduce que los alcaloides han estado presentes de manera significativa, al igual que otros metabolitos como los glucosinolatos e isociocianatos, los cuales son comunes en la familia Brassicaceae. En esta familia, las condiciones estresantes son percibidas por el organismo y se promueve la síntesis y expulsión de glucosinolatos desde la vacuola al citoplasma, donde son convertidos a isotiocianatos por la enzima mirosinasa. Esta última pueden regular la transducción o acumulación de transportadores y canales de membrana, según la necesidad. Es por eso que estos compuestos son específicamente importantes en esta familia, por su participación en la adaptación a situaciones de estrés abiótico (Del Carmen et al., 2013).

Existen varias metodologías para determinar la capacidad antioxidante *in vivo* e *in vitro*. Una de las más utilizadas es la que evalúa la inhibición del radical libre 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) por los compuestos con probable actividad antioxidante. En el presente trabajo, la inhibición de DPPH alcanzó el 90.299% (Tabla 6). La bibliografía registra muchas investigaciones que analizan la capacidad antioxidante de compuestos obtenidos a partir de material vegetal. Reyes-Munguía et al., (2016) mostraron una gran

diversidad de plantas de diferentes familias con actividad antioxidante, principalmente a partir de extractos acuosos y metanólicos, y también etanólicos. La mayoría presenta una inhibición de más del 90% de DPPH. Además, para el caso del extracto metanólico de *Lepidium meyenii*, los autores reportaron una neutralización del 88.21% del radical libre. Sandoval et al.(2002) reportaron una inhibición de DPPH dosis-dependiente a partir de extracto acuoso de hipocótilo de maca, además de hallar que el extracto de maca pudo proteger el ADN de los macrófagos de la línea RAW 264.7 del daño producido por radicales libres como peroxinitrito, previniendo la apoptosis inducida. Esta capacidad antioxidante también se verificó en extractos de las hojas de maca, de manera dosis-dependiente (Cuentas et al., 2008).

La actividad antioxidante responde en parte a la presencia de flavonoides en los extractos de maca, la cual obedece al número y ubicación de grupos hidroxilos aromáticos, debido probablemente a la pérdida vulnerable de un protón y la descolocación de electrones por resonancia (Chen et al., 1996). Zha et al. (2014) atribuyen propiedades antioxidantes a polisacáridos extraídos a partir de *Lepidium meyenii* al comprobar la inhibición de radicales hidroxilo, anión superóxido y DPPH. La inhibición por estos polisacáridos es menor que la reportada para los extractos acuoso y metanólico, sin embargo, se puede inferir que los polisacáridos podrían haber contribuido en la capacidad total de los extractos metanólicos. Los isotiocianatos también muestran actividad antioxidante (Fahey et al., 2001). La mayor actividad antioxidante del EM del presente estudio en comparación con lo reportado por Reyes-Munguía et al. (2016) debe estar relacionado a la presencia diferencial de metabolitos secundarios como flavonoides o alcaloides en los ejemplares de maca utilizados, tal como se explicó con anterioridad.

La viabilidad celular de las PBMC no se afectó al ser expuestas al EM de maca morada (Figura 26). Estos resultados refuerzan lo descrito por Valerio & Gonzáles (2005) quienes, a través de una amplia revisión bibliográfica, pudieron atribuir la ausencia de toxicidad de la maca en modelos *in vivo* e *in vitro*. Esto resulta

particularmente importante si es que se quiere utilizar a la maca con fines terapéuticos. Se pudo observar también una estimulación de las PBMC tratadas con 25 µg/mL de EM, lo cual pudo deberse a la riqueza de elementos nutritivos del EM que pudieron haber promovido el incremento de las células o a posibles compuestos mitogénicos como giberelina o auxina.

La producción de EROs por PBMC no se afectó significativamente al ser expuestas a EM. Investigaciones realizadas en base a las propiedades antioxidantes que tienen uno o más compuestos *in vitro* muchas veces se relaciona con propiedades antiinflamatorias al inhibir la producción de EROs; estos radicales promueven la producción de citoquinas proinflamatorias, y en concentraciones elevadas inducen al daño y muerte celular (Bak et al., 2013), exacerbando los procesos inflamatorios. Los compuestos antioxidantes tienen la capacidad de neutralizar estos radicales libres por lo que indirectamente disminuyen o neutralizan estos procesos.

También se encuentra documentado el efecto inhibitorio sobre la expresión del NF-κB (Nair et al., 2006). De esta manera, algunos polifenoles han sido ensayados pudiéndose comprobar propiedades antiinflamatorias, antiaterogénicas, antialérgicas, anticancerígenas, entre otras (Di Carlo et al., 1999). Arenas-Chávez et al., (2018) probaron una fracción flavonoide obtenida a partir del extracto metanólico de *Lepechinia meyenii*, Walpers sobre neutrófilos y células mononucleares a fin de evaluar la producción del anión superóxido (por reducción de NBT) y expresión de genes proinflamatorios. Ellos encontraron que la fracción denominada LM8 inhibe la producción de anión superóxido de manera proporcional a su concentración en comparación con las células estimuladas con PMA, pero esta producción fue mayor a la registrada en las células sin estímulo alguno.

Se debe tomar en consideración que el EM presenta un *cocktail* de metabolitos secundarios, que pueden estar actuando de manera sinérgica o antagónica, según determinado proceso fisiológico. Es así que la producción de EROs puede estar

favorecida por elementos proinflamatorios, pero neutralizada por la acción de algunos antioxidantes.

Respecto a las PBMC estimuladas con PMA, claramente se pudo observar una estimulación significativa ($p < 0.05$). El PMA es un potente activador celular, puesto que modula la proliferación y activa varias vías de señalización intracelular en las que participan proteínas de la familia de la protein kinasa C (Hug & Sarre, 1993) quien a su vez activa varias proteínas citosólicas que fosforiladas, se mueven a la cara interna de la membrana celular (promovido por Rac-1) donde interactúan y activan al citocromo b558. El citb558 activado captura oxígeno molecular y lo transforma en anión superóxido (Rojas-Espinoza & Arce-Paredes, 2004). Este compuesto ha sido ampliamente utilizado como activador de células fagocíticas mononucleares y polimorfonucleares (Daigneault et al., 2010; Bass et al., 1983).

El análisis de la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- α se realizó tomando en cuenta tres diferentes controles positivos: células estimuladas con PMA, con PHA y con ambos activadores a la vez. Esto se hizo tomando en cuenta lo reportado por Sullivan et al. (2000), quienes demostraron que al estimular las PBMC con ambos compuestos, se incrementó la secreción y expresión de las citoquinas IL-2, IL-4, IFN- γ y TNF- α , debido a que en conjunto activan múltiples vías de señalización, permitiendo una amplia estimulación. Además, PHA y PMA han sido utilizados independientemente en otros estudios como activadores de linfocitos y fagocitos, respectivamente (Arenas-Chávez, 2018).

A nivel de expresión génica, a las 18 h no se pudo observar un incremento significativo en células estimuladas por EM, aunque se pudo apreciar un ligero incremento en comparación al control negativo. Todos los controles positivos expresaron más cantidad de mRNA para TNF- α ($p < 0.05$). La secreción de la citoquina registró valores significativamente superiores en los controles positivos, de mayor a menor se obtuvo PHA > PMA+PHA > PMA. En contraste con la expresión génica, las células tratadas con EM800 secretaron cantidades significativas de TNF- α , aunque en

menor medida que los controles positivos. Esta aparente diferencia entre la expresión y secreción concuerda con los hallazgos de Sullivan et al., (2000), quienes encontraron que a las 4 h de estimulación con PMA y PHA los niveles del mensajero fueron mayores que a las 24 h. Valencia (2002), al describir las propiedades de la citoquina, indicó que la vida media del mensajero es corta en linfocitos, e incluso menor en monocitos/macrófagos. De ahí es coherente inferir que el EM800 ha podido tener un pico de síntesis de mRNA muchas horas antes que al momento de la extracción (18 h). Sin embargo, la citoquina secretada se ha podido estar acumulando en el medio de cultivo, por lo que la reacción fue notablemente positiva.

En refuerzo de lo anterior, se pudo observar a las 18 h, una estimulación dosis-dependiente de NO, el cual es un conocido factor inflamatorio que juega varios roles importantes en células inmunitarias como agente tóxico contra organismos infecciosos.

Los compuestos fenólicos presentes en el EM podrían estimular la producción de IFN- γ con la participación de p38 MAPK (Magrone et al., 2008a) o a partir de la inducción de la respuesta Th1 por medio de la estimulación de IL-12 (Magrone et al., 2008b). Los flavonoides también tienen ese efecto sobre la producción de esta citoquina (Arenas-Chávez et al., 2018). Se le ha atribuido al IFN- γ la capacidad de ser un activador de monocitos/macrófagos (Young & Hardy, 1995) que promueve una mejor actividad antimicrobiana al estimular la producción de moléculas efectoras como el NO por iNOS. Esta estimulación se da directamente por factores reguladores dependientes de IFN- γ (como el factor regulador 1 dependiente de interferón) que interactúan con la zona promotora del gen iNOS (Martin et al., 1994). Además se ha comprobado un efecto de sinergia entre esta citoquina y el LPS (James, 1995). Generalmente se le imputa la síntesis de interferón gamma a la subpoblación de linfocitos CD4⁺ Th1 las cuales promueven las respuestas inmunes celulares, relacionadas con procesos de inflamación (Young & Hardy, 1995; Estrada et al., 2002). Alzamora et al. (2007d) demostraron que el extracto metanólico del ecotipo morado de *Lepidium meyenii*, a la misma concentración evaluada en el presente estudio, fomenta significativamente la

producción *in vitro* de IFN- γ , demostrando así la activación de linfocitos T por este EM. Estos autores mencionaron que aún es desconocida la ruta por la cual el EM tendría este efecto, además ponen en evidencia la composición diferencial de constituyentes con actividad inmunomoduladora entre ecotipos. De manera similar, Leiva-Revilla et al., (2014) reportaron un incremento de IFN- γ en suero de ratas ovariectomizadas y tratadas con extracto hidroalcohólico del ecotipo rojo de maca, sugiriendo que este extracto podría mejorar parámetros de inmunidad celular (actividad de células Th1) en mujeres posmenopáusicas.

Park et al.,(2000) evaluaron la actividad de flavonoides monoméricos, diméricos y triméricos (procianidinas) sobre la producción de NO, TNF- α , y expresión de NF-kB en macrófagos de la línea RAW 264.7. Se utilizó la citoquina IFN- γ como estimulador de macrófagos. Se obtuvo que los macrófagos sin estímulo secretaron pequeñas cantidades de TNF- α en el medio, lo cual concuerda con lo encontrado en la presente investigación. Además, las células estimuladas con flavonoides monoméricos y diméricos inhibieron ligeramente la síntesis de esta citoquina, mientras que los flavonoides triméricos la favorecieron significativamente. De igual manera, los flavonoides triméricos favorecieron significativamente la producción de NO y activación de NF-kB en células estimuladas, mientras que los diméricos las inhibieron de manera moderada. De esta investigación se desprende que el grado de polimerización de los flavonoides parece ser importante en la determinación del mecanismo por el cual pueden ejercer su actividad inmunomoduladora. Es conveniente mencionar que, a pesar de las investigaciones que muestran una inhibición de NFkB por compuestos antioxidantes, y considerando que la capacidad antioxidante de las procianidinas triméricas es mayor que la de las diméricas o flavonoides monoméricos (Plumb et al., 1998), esta característica no se ve reflejada en la activación de este factor de transcripción. No está del todo claro las diferencias halladas sobre el papel de los flavonoides sobre la secreción de TNF- α y producción de NO.

Otros autores han encontrado otros compuestos fenólicos capaces de promover la producción de TNF- α . Wadsworth & Koop (1999) comprobaron el efecto estimulante del polifenol resveratrol sobre los niveles basales de mRNA y proteína de TNF- α , además mejoró los niveles de los mismos al estimular previamente las células RAW264.7 con LPS. Asimismo, Wang & Mazza (2002) le atribuyen la capacidad de estimular la producción de TNF- α a la isoflavona daidzeína (obtenida de fuentes naturales). Las antocianidinas y los extractos ricos en antocianinas indujeron la producción de TNF- α y actuaron como moduladores de la respuesta inmune en los macrófagos activados; sin embargo, inhiben la producción de NO. Estos resultados no soportan la premisa que los antioxidantes inhiben la activación inducida (por LPS o IFN) del factor NF-kB; más bien, estarían actuando selectivamente sobre los genes que son regulados por este factor.

Otros elementos aislados de *Lepidium meyenii* han sido evaluados como moduladores de las respuestas inmunes. Un grupo de investigadores chinos lograron aislar y purificar polisacáridos de los hipocótilos de maca. MP21 fue uno de los polisacáridos purificados, el cual activó a los macrófagos de la línea RAW264.7, incrementando los niveles de TNF- α e IL-1 β secretado (detectado por ELISA), producción de iNOS y NO. Dicha estimulación fue mayor a altas concentraciones (500-1000 μ g/mL), superando al estímulo por LPS, demostrándose dosis-dependencia. También analizaron la expresión de la subunidad p65 de NF-kB, verificándose su alta expresión en macrófagos tratados con altas dosis de MP21. Esto sugeriría que sería la principal vía de activación por la que se promueve la síntesis de TNF- α y NO (Wang et al., 2016). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente investigación, respecto a TNF- α secretado, aunque el nivel de mRNA transcripcional no fue significativo, se puede deducir que la producción de esta citoquina a las 18 h se encuentra en su mejor nivel.

Zhang et al. (2016), en un estudio similar al realizado por Wang et al. (2016), encontraron resultados similares para un polisacárido denominado MC-1, con meras

variaciones respecto a la respuesta dependiente de la dosis para la producción de TNF- α , es decir, el estímulo fue más notorio al comparar dos concentraciones bajas de MC-1 (entre 62.5 y 125 μ g/mL) que a grandes concentraciones. Sin embargo, se mantiene la tendencia de mayor producción a concentraciones mayores, lo cual refuerza lo obtenido en la presente investigación. La respuesta fue similar para IL-6. Lo más resaltante de su trabajo fue que lograron demostrar la dependencia de PRRs específicamente TLR-2, receptor de manosa (MR), y *complement receptor 3* (CR3) en la producción de las citoquinas evaluadas y NO. TLR-2 podría ser un receptor para estos polisacáridos, desencadenándose una cascada que involucraría a MyD88/IRAK/TRAF6 y terminaría en la activación y translocación de NF- κ B al núcleo. CR3 y MR activan otras cascadas que coadyuvarían el efecto demostrado. La actividad inmunomoduladora de los polisacáridos estaría explicada en su composición y estructura, regido por los tipos de enlace y monómeros que presentan (Ferreira et al., 2015).

Sobre los efectos del EM estudiados en la presente investigación y su actividad estimulante sobre la producción de NO, expresión y secreción de TNF- α , se ha planteado los posibles mecanismos (Figura 34):

1. Se ha documentado que algunos compuestos fenólicos como polifenoles o flavonoides estimulan la producción de IFN- γ por PBMC. Incluso Alzamora et al. (2007d) y Leiva-Revilla et al. (2014) demostraron el efecto estimulante del ecotipo morado en PBMC y ecotipo rojo en ratas, respectivamente, sobre la producción de esta citoquina. El EM presenta cantidades altas de compuestos fenólicos, que estarían estimulando a los linfocitos promoviendo la síntesis de IFN- γ , que a su vez funcionaría como activador de monocitos/macrófagos mejorando su capacidad de síntesis de NO y factor de necrosis tumoral alfa, promoviendo factores de transcripción para iNOS y activando la vía de NF- κ B.
2. Algunos compuestos fenólicos como polifenoles, isoflavonas, antocianinas promueven la síntesis de TNF- α , activando al NF- κ B. El mismo TNF- α actúa sobre

la cascada de activación de NF- κ B, generándose un *feed back* positivo (Park et al., 2000). El efecto se potenciaría al considerar una coestimulación por IFN- γ .

3. Polisacáridos presentes en el EM con actividad inmunoestimulante actuarían a través de la activación de PRRs, iniciándose una cascada de señalización interna que involucraría a IRAK/TRAF6 y terminaría en la activación y translocación de NF- κ B al núcleo.

Estos tres posibles mecanismos no serían mutuamente excluyentes, pudiéndose incluso presentar de manera cooperativa entre sí.

Los contrastes con los trabajos de Gonzales et al. y Gasco (2014) podrían deberse al ecotipo empleado y el método de extracción; además que en tejido prostático se debería evaluar otros factores locales. Por su parte, Alzamora et al., (2007c) reportaron una ligera disminución en la producción de NO por macrófagos peritoneales de ratón tratados con el ecotipo rojo, que dejaría entrever un posible efecto antiinflamatorio en contraste a un aumento para el ecotipo morado. De esta manera se observa una posible diferencia debido al ecotipo de maca, que se sustenta en la presencia diferencial de metabolitos secundarios.

Los resultados de esta investigación evidencian la necesidad de recategorizar a *Lepidium meyenii* Walpers respecto a su participación en los procesos inflamatorios. Si bien es cierto, el efecto hallado en esta investigación y los mecanismos que posiblemente estén rigiéndolo evidencian un potenciamiento de la respuesta inmune innata celular, es probable que la administración de este tubérculo en personas con hiperfunción inmunológica o enfermedades inflamatorias deba ser limitado.

Finalmente, visto el rol del NO y TNF- α en la protección de los organismos, se debe realizar un esfuerzo enfocado al desarrollo de agentes terapéuticos que modulen su expresión. Así, previa estandarización en su cultivo y extracción de principios activos, la maca morada sería un candidato factible de realizarse futuras investigaciones

preclínicas para proponerla como agente terapéutico. Además, ciertas fracciones podrían servir como adyuvante inmunológico.

En la Figura 34 se proponen los mecanismos hipotéticos de activación de PBMC por metabolitos secundarios que están presentes en el extracto metanólico de maca (ecotipo morado) empleado en el desarrollo de la presente investigación.

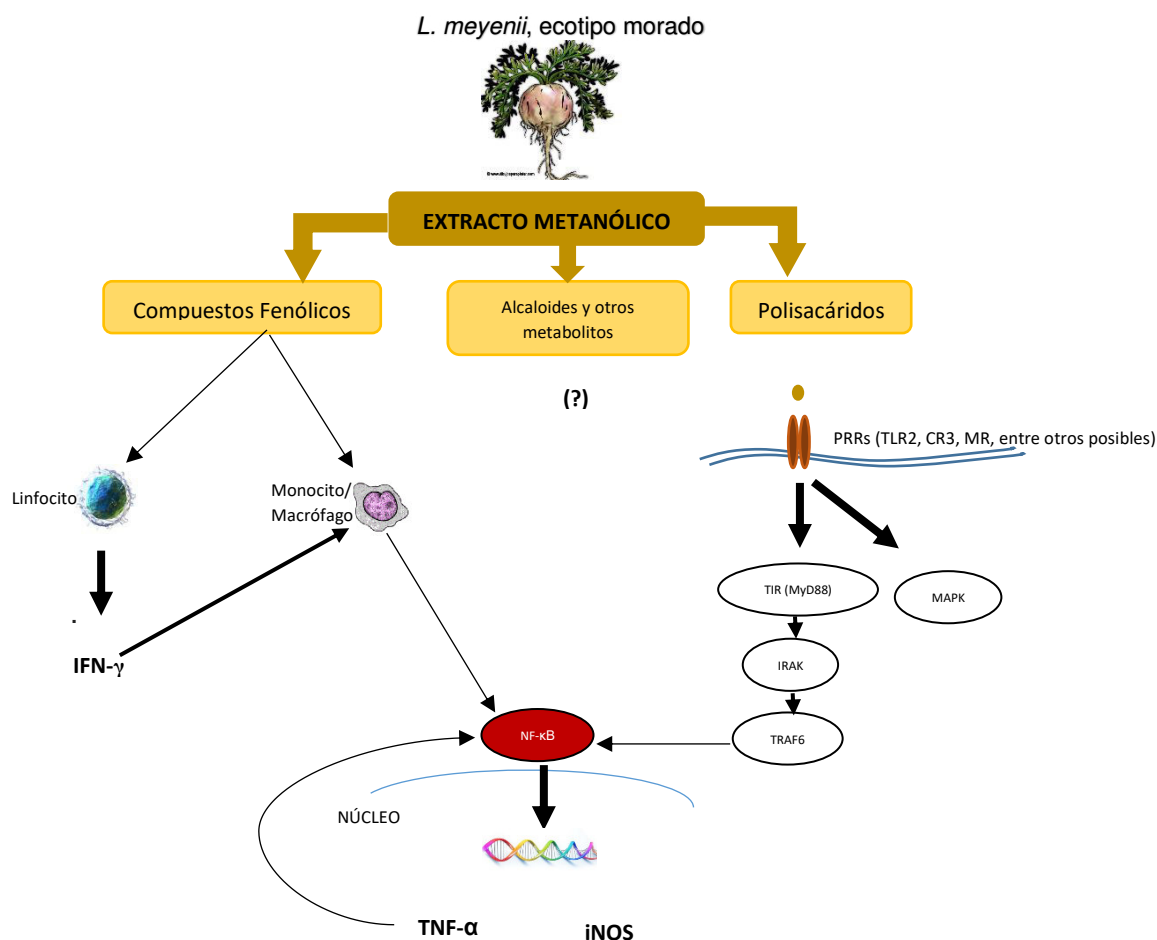


Figura 34. Mecanismos hipotéticos de activación de PBMC. Los compuestos fenólicos serían capaces de estimular directamente a los monocitos/macrófagos para promover la síntesis de TNF- α y NO, activando la vía de señalización que involucra al NF- κ B, o indirectamente a través de linfocitos. Algunos polisacáridos de maca serían capaces de interaccionar con algunos PRRs, activando una o más cascadas de señalización que podrían cooperar entre sí para la activación del NF- κ B y posterior síntesis de TNF alfa y NO por iNOS. El TNF alfa a su vez estimula la activación del mismo factor de transcripción, regulando su síntesis a través de un *feed back* positivo. Todas las vías mostradas podrían funcionar sinérgicamente. No se descarta el efecto de otros metabolitos como alcaloides.

VII. CONCLUSIONES

- 7.1 El extracto metanólico de *Lepidium meyenii*, Walpers, ecotipo morado, posee capacidad antioxidante, relacionado a la presencia de compuestos fenólicos como polifenoles, flavonoides y antocianinas.
- 7.2 El extracto metanólico de *Lepidium meyenii*, Walpers, ecotipo morado, no presenta efecto citotóxico sobre las PBMC.
- 7.3 El extracto metanólico de *Lepidium meyenii*, Walpers, ecotipo morado, no estimula de manera significativa la producción de anión superóxido por células mononucleares de sangre periférica humana.
- 7.4 El extracto metanólico de *Lepidium meyenii*, Walpers ecotipo morado estimula la respuesta inmune innata al promover significativamente la producción de óxido nítrico por PBMC, mostrando una tendencia dosis-dependiente.
- 7.5 El extracto metanólico de *Lepidium meyenii*, Walpers ecotipo morado promueve la expresión de mRNA para TNF- α a las 18 h de cultivo.
- 7.6 El extracto metanólico de *Lepidium meyenii*, Walpers, ecotipo morado, promueve de manera significativa la secreción de TNF- α a las 18h de cultivo.

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1 Repetir la presente investigación en células polimorfonucleares y/o en macrófagos previamente diferenciados, para confirmar un efecto amplio.
- 8.2 Realizar estudios de cinética de producción de TNF- α en cuanto la expresión y secreción.
- 8.3 Evaluar la expresión génica de iNOS, para confirmar el efecto observado en la presente investigación
- 8.4 Evaluar la producción de otras citoquinas como IL-12 e IL-10 para corroborar el efecto del extracto metanólico de *Lepidium meyenii* en procesos inflamatorios.
- 8.5 Diseñar un protocolo experimental para evaluar el efecto de este extracto sobre la producción de citoquinas proinflamatorias *in vivo*, en un modelo animal.
- 8.6 Estudiar la producción de NO y TNF- α conjuntamente con IFN- γ en PBMC.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez Salazar, E. K. (2008). Estudio comparativo de la actividad moduladora del extracto metanólico de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón (maca) sobre la respuesta inmune humoral y celular en ratones. Tesis para optar al título de Bióloga. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/919>

Alzamora, L. (2003). Estudio del efecto antitumoral e inmunomodulador del extracto alcaloidal de raíces de *Lepidium peruvianum* G. Chacón «maca» (Brassicaceae), en ratones. Tesis para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas. Unidad de postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 191 pp.

Alzamora, L., Solís, H., Rojas, M., Calderón, M., Fajardo, N., Quispe, J. Alvarez, E., Colona, E. & Torres, D. (2007a). Actividad leishmanicida de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum*, Chacón (Brassicaceae). *Revista Peruana de Biología*, 13(3): 211-214

Alzamora, L., Colona, E., Acero de Mesa, N., Galán de Mera, A., Muñoz-Mingarro, D., Linares, F., & Alvarez, E. (2007b). Efecto citotóxico del extracto metanólico de tres ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre líneas celulares HeLa y HT-29. *Revista Peruana de Biología*, 13(3): 219-222.

Alzamora, L., Alvarez, E., Torres, D., Solís, H., Colona, E., Quispe, J., & Chanco, M. (2007c). Efecto de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre la producción de óxido nítrico in vitro. *Revista Peruana de Biología*, 13(3): 215-218

Alzamora, L., Galván, P., Alvarez, E., Torres, D., Colona, E., Aliaga, M., & Marcelo, Á. (2007d). Producción de IFN- γ en cultivos de linfocitos humanos por efecto de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum*, Chacón (Brassicaceae). *Revista Peruana de Biología*, 13(3): 207-210.

Arenas-Chavez, C. A., Wiche-Salinas, T., Valencia-Mercado, I., Calle-Valdez, R., Vera-Gonzales, C., Malaga-Contreras, S., ... & Huanqui-Guerra, C. (2018). Efecto antiinflamatorio de la fracción flavonoide de *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling (Salvia)

sobre leucocitos de pacientes con artritis reumatoide. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35, 55-61.

Atal, C. K., Sharma, M. L., Kaul, A., & Khajuria, A. (1986). Immunomodulating agents of plant origin. I: Preliminary screening. *Journal of ethnopharmacology*, 18(2): 133-141.

Badwey, J. A., & Karnovsky, M. L. (1980). Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annual review of biochemistry*, 49(1), 695-726.

Baehner, R. L. (1968). Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*, 278, 971-976.

Bak, M. J., Truong, V. L., Kang, H. S., Jun, M., & Jeong, W. S. (2013). Anti-inflammatory effect of procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.

Balenga, N. A., & Balenga, N. A. (2007). Human TLR11 gene is repressed due to its probable interaction with profilin expressed in human. *Medical hypotheses*, 68(2), 456.

Barrantes, A. (1975). La Prueba de Reducción del NBT. Significado, utilidad e implicaciones. Rey. Cubo Pedo, 47, 5. Disponible en <http://www.binasss.sa.cr/revistas/amc/v19n11976/art9.pdf>

Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejda, P., Seeds, M. C., & Thomas, M. (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *The Journal of Immunology*, 130(4), 1910-1917.

Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular immunology*, 40(12), 845-859.

Brack, A., (2004). Biodiversidad. *Pobreza y Bionegocios*, PNUD, Lima, Perú. <https://www.cbd.int/doc/bioday/2009/peru/idb-2009-peru-gvt-es.pdf>

Caballero-Gutiérrez, L., & Gonzáles, G. F. (2016). Alimentos con efecto anti-inflamatorio. *Acta Médica Peruana*, 33(1): 50-64.

Cárdenas, R. A. (1995). *Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la maca: Lepidium meyenii*, Walpers (No. 82). Convenio Andrés Bello.

Chang, Z. L. (2009). Recent development of the mononuclear phagocyte system: in memory of Metchnikoff and Ehrlich on the 100th Anniversary of the 1908 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Biology of the Cell*, 101(12), 709-721.

Chen, Z. Y., Chan, P. T., Ho, K. Y., Fung, K. P., & Wang, J. (1996). Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids*, 79(2), 157-163.

Chuang, T. H., & Ulevitch, R. J. (2001). Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1518(1-2), 157-161.

Collado, V. M., Porras, R., Cutuli, M. T., & Gómez-Lucía, E. (2008). El sistema inmune innato I: sus mecanismos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2(1), 1-16.

Colona Vallejos, E. H. (2017). Expresión de inmunocitoquinas e inmunofenotipificación de células mononucleares de sangre periférica humana tratadas con la lectina de *Lupinus mutabilis* sweet (Tarwi), ecotipo Patón Grande. Tesis para optar al grado de Magíster en Biología molecular, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Csiszar, A., Nagy, G. Y., Gergely, P., Pozsonyi, T., & Pocsik, E. (2000). Increased interferon-gamma (IFN- γ), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical & Experimental Immunology*, 122(3), 464-470.

Cuéllar Ponce de León, L. E. (2013). Infecciones en huéspedes inmunocomprometidos. *Revista Medica Herediana*, 24(2), 156-162.

Cuentas R., De la Cruz, L., Hernández, M., Castañeda, B. C., Vasquez, L. I., & Llica, E. R. (2008). Evaluación del efecto antioxidante de hojas de *Lepidium peruvianum* Chacón, "Maca". *Horizonte Médico*, 8(1), 45-55.

Cui, B., Zheng, B. L., He, K., & Zheng, Q. Y. (2003). Imidazole Alkaloids from *Lepidium meyenii*. *Journal of natural products*, 66(8), 1101-1103.

Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one*, 5(1), e8668.

Del Carmen Martínez-Ballesta, M., Moreno, D. A., & Carvajal, M. (2013). The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in Brassica. *International journal of molecular sciences*, 14(6), 11607-11625.

Denzler, K. L., Waters, R., Jacobs, B. L., Rochon, Y., & Langland, J. O. (2010). Regulation of inflammatory gene expression in PBMCs by immunostimulatory botanicals. *PloS one*, 5(9), e12561.

De Mello, V. D. F., Kolehmanien, M., Schwab, U., Pulkkinen, L., & Uusitupa, M. (2012). Gene expression of peripheral blood mononuclear cells as a tool in dietary intervention studies: what do we know so far?. *Molecular nutrition & food research*, 56(7), 1160-1172.

D'Arrigo, Guadalupe, Benavides, Víctor, & Pino, José. (2004). Evaluación preliminar del efecto de *Lepidium meyenii* Walp en el desarrollo embrionario de ratón. *Revista Peruana de Biología*, 11(1), 103-106.

D'Ettorre, G., Ceccarelli, G., Zaffiri, L., Mastroianni, C. M., & Vullo, V. (2010). The role of HIV-DNA testing in clinical practice. *The new microbiologica*, 33(1), 1.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), 337-353.

Dini, A., Migliuolo, G., Rastrelli, L., Saturnino, P., & Schettino, O. (1994). Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food chemistry*, 49(4), 347-349.

Dini, I., & Tenore, G. C. (2002). Glucosinolates from Maca. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 1087-1090.

Estrada, R. B., Nagore, E., Sanmartín, O., Sevilla, A., Guillén, C., Escudero, M., ... & Fenollosa, B. (2002). Estudio del patrón de citocinas (Th1/Th2) producido por linfocitos T periféricos y del existente en tejido tumoral de pacientes con melanoma en diferentes estadios. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 93(1-2), 87-101.

Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., & Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), 5-51.

Fernandes de Oliveira, A., Mercenaro, L., Del Caro, A., Pretti, L., & Nieddu, G. (2015). Distinctive anthocyanin accumulation responses to temperature and natural UV radiation of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars. *Molecules*, 20(2), 2061-2080.

Ferreira, S. S., Passos, C. P., Madureira, P., Vilanova, M., & Coimbra, M. A. (2015). Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydrate polymers*, 132, 378-396.

Fulzele, S. V., Satturwar, P. M., Joshi, S. B., & Dorle, A. K. (2003). Study of the immunomodulatory activity of Haridradi ghrita in rats. *Indian journal of Pharmacology*, 35(1), 51-54.

Gasco T, E.M. (2014). Efecto diferencial de *Lepidium meyenii* (Maca roja) y finasteride sobre los procesos inflamatorios en la hiperplasia prostática benigna inducida con enantato de testosterona en ratas de la cepa Holtzman. Tesis Para Optar al Grado de Doctor en Ciencias Con mencion en Fisiologia. UPCH. Disponible en http://dspace.concytec.gob.pe/bitstream/concytec/97/1/gasco_mt.pdf

Gonzales, G.F.; Córdova, A.; Gonzales, C.; Chung, A.; Villena, A.; Vega, K. (2001). *Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. *Asian Journal Androl* 3: 301-303

Gonzales-Castañeda, C., & Gonzales, G. F. (2008). Hypocotyls of *Lepidium meyenii* (maca), a plant of the Peruvian highlands, prevent ultraviolet A-, B-, and C-induced skin damage in rats. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 24(1), 24-31.

Gonzales, G. F., Gonzales, C., & Gonzales-Castaneda, C. (2009). *Lepidium meyenii* (Maca): a plant from the highlands of Peru—from tradition to science. *Complementary Medicine Research*, 16(6), 373-380.

Gonzales, G. F. (2010). Maca: del alimento perdido de los incas al milagros de los andes. estudio de seguridad alimentaria y nutricional. *Segurança Alimentar e Nutricional*, 17(1), 16-36.

Gonzales, G. F., Villaorduña, L., Gasco, M., Rubio, J., & Gonzales, C. (2014). Maca (*Lepidium meyenii* Walp), una revisión sobre sus propiedades biológicas. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 31(1), 100-110.

Granger, D. L., & Lehninger, A. L. (1982). Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *The Journal of Cell Biology*, 95(2), 527-535.

Griess, P. (1879). Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 12(1), 426-428.

Gutiérrez, L. F. C. (2009). La evolución de sistemas complejos: el caso del sistema inmune en animales. *Acta Biológica Colombiana*, 14(4s), 247-254.

Hatai, H., Lepelley, A., Zeng, W., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2016). Toll-like receptor 11 (TLR11) interacts with flagellin and profilin through disparate mechanisms. *PloS one*, 11(2), e0148987.

Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S. O., ... & Crozat, K. (2003a). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*, 424(6950), 743.

Hoebe, K., Janssen, E. M., Kim, S. O., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Han, J., & Beutler, B. (2003b). Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nature immunology*, 4(12), 1223.

Hug, H., & Sarre, T. F. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?. *Biochemical Journal*, 291(Pt 2), 329.

James, S. L. (1995). Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiological Reviews*, 59(4), 533-547.

Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Quant Biol*, 54, 1-13.

Kimbrell, D. A., & Beutler, B. (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Reviews Genetics*, 2(4), 256.

Knowles, R. G., & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, 298(Pt 2), 249.

Kuby, Janis. Immunology, (1994). WH Freeman and, 1994, vol. 178, p. 582-588.

Lanz-Mendoza, H., & Hernández-Martínez, S. Y. (2015). Darwin tenía razón. La evolución del sistema inmunitario. *Ciencia*, 66, 60-6.

Leiva-Revilla, J., Guerra-Castañón, F., Olcese-Mori, P., Lozada, I., Rubio, J., Gonzales, C., & Gonzales, G. F. (2014). Efecto de la maca roja (*Lepidium meyenii*) sobre los niveles de IFN- γ en ratas ovariectomizadas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31(4): 683-688.

Li, G., Ammermann, U., & Quirós, C. F. (2001). Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacon) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Economic botany*, 55(2), 255-262.

Li, X., Tian, F., & Wang, F. (2013). Rheumatoid arthritis-associated microRNA-155 targets SOCS1 and upregulates TNF- α and IL-1 β in PBMCs. *International journal of molecular sciences*, 14(12), 23910-23921.

LLANES, Doris (2009). Actividad inmunomoduladora de extractos de 10 plantas de la familia euphorbiaceae. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

Lomonte, B. (2009) Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica, Universidad de Costa Rica. Disponible en:

[http://repositorio.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/9243/Manual de Laboratorio Inmunologia Clinica.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/9243/Manual_de_Laboratorio_Inmunologia_Clinica.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

López-Bojorquez, L. N. (2004). La regulación del factor de transcripción NF- κ B. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Revista de investigación clínica*, 56(1), 83-92.

López Luengo, M. T. (2008). Plantas medicinales con actividad inmomoduladora: revisión. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 27(11), 58-61.

Magrone, T., Candore, G., Caruso, C., Jirillo, E., & Covelli, V. (2008a). Polyphenols from red wine modulate immune responsiveness: biological and clinical significance. *Current pharmaceutical design*, 14(26), 2733-2748.

Magrone, T., Tafaro, A., Jirillo, F., Amati, L., Jirillo, E., & Covelli, V. (2008b). Elicitation of immune responsiveness against antigenic challenge in age-related diseases: effects of red wine polyphenols. *Current pharmaceutical design*, 14(26), 2749.

Marchi, L. F., Sesti-Costa, R., Ignacchiti, M. D. C., Chedraoui-Silva, S., & Mantovani, B. (2014). In vitro activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma: increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. *International immunopharmacology*, 18(2), 228-235.

Marín-Bravo, M. (2003). Histología de la maca, *Lepidium meyenii* Walpers (Brassicaceae). *Revista Peruana de Biología*, 10(1), 101-108.

Martin, E., Nathan, C., & Xie, Q. W. (1994). Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine*, 180(3), 977-984.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271-278.

Martínez Manrique, C. E. (2006). Modulación de la respuesta inmune: tendencias actuales. *Revista cubana de Investigaciones Biomédicas*, 25(4), 0-0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002006000400009

Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Brooks, T. M., Pilgrim, J. D., Konstant, W. R., Da Fonseca, G. A., & Kormos, C. (2003). Wilderness and biodiversity conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10309-10313.

Molina-Vargas, L. F. (2013). Mechanism of action of isothiocyanates. A review. *Agronomía Colombiana*, 31(1), 68-75.

Morris Quevedo, H. J., Martínez Manrique, C., Abdala Díaz, R. T., & Campos Orama, D. (1999). Adyuvantes inmunológicos. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(2), 130-137.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

Muñoz, R., & Alfaro, W. (2000). Estandarización de la técnica de reducción del NBT mediante lectura en placas de microELISA. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 35(1-2), 29-39.

Nagarathna, P. K. M., Reena, K., Reddy, S., & Wesley, J. (2013). Review on immunomodulation and immunomodulatory activity of some herbal plants. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 22(1), 223-230.

Nair, M. P., Mahajan, S., Reynolds, J. L., Aalinkeel, R., Nair, H., Schwartz, S. A., & Kandaswami, C. (2006). The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. *Clinical and vaccine immunology*, 13(3), 319-328.

Nakagawara, A., Nathan, C. F., & Cohn, Z. A. (1981). Hydrogen peroxide metabolism in human monocytes during differentiation in vitro. *The Journal of clinical investigation*, 68(5), 1243-1252.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.

Nussler, A. K., & Billiar, T. R. (1993). Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *Journal of leukocyte biology*, 54(2), 171-178.

Obregón, L. E. (1999). Maca. Planta medicinal y nutritiva del Perú. *Natura Medicatrix: Revista médica para el estudio y difusión de las medicinas alternativas*, (55), 26-27.

Palma-Gutiérrez, E., Prado-Bravo, C., Loja-Herrera, B., & Salazar-Granara, A. (2012). Características fitoquímicas de muestras comerciales de maca en tres regiones de Perú. *Ciencia e Investigación Médico Estudiantil Latinoamericana*, 17(2).

Park, B. H., Fikrig, S. M., & Smithwick, E. M. (1968). Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils: A diagnostic aid. *The Lancet*, 292(7567), 532-534.

Park, Y. C., Rimbach, G., Saliou, C., Valacchi, G., & Packer, L. (2000). Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF- α secretion, and NF- κ B-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS letters*, 465(2-3), 93-97.

Pfeiffer, R. (1892). Untersuchungen über das Cholera gift. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 11(1), 393-412.

PLAYFAIR, John Hugh Lyon. Inmunología en esquemas. Alhambra, 199_. Sexta edición, p. 10.

Plaeger, S. F. (2003). Clinical immunology and traditional herbal medicines. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10(3), 337-338.

Plumb, G. W., De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., & Williamson, G. (1998). Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Research*, 29(4), 351-358.

Reyes-Munguía, A., Carrillo-Inungaray, M. L., Carranza-Álvarez, C., Pimentel-González, D. J., & Alvarado-Sánchez, B. (2016). Antioxidant activity, antimicrobial and effects in the immune system of plants and fruits extracts. *Frontiers in Life Science*, 9(2), 90-98.

Reynés Miralles, B. (2014). Estudio de las células sanguíneas como fuente de marcadores transcriptómicos de utilidad para la investigación de la obesidad y sus complicaciones. Tesis doctoral. 2014. Disponible en: http://dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/2606/Reynes_Miralles_Barbara.pdf?sequence=1

Rojas-Espinosa, O., & Arce-Paredes, P. (2004). Fagocitosis: mecanismos y consecuencias Tercera parte. *Bioquímica*, 29(2), 55-67.

Rosete, P. G., Sánchez, R. C., Ledesma, R. L., Mancilla, B. E., & Galindo, E. Z. (1999). Óxido nítrico, una molécula multifuncional. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 12(4), 300-304.

Rubio, J., Caldas, M., Dávila, S., Gasco, M., & Gonzales, G. F. (2006). Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii* (Maca) on learning and depression in ovariectomized mice. *BMC complementary and alternative medicine*, 6(1), 23.

Salaverry, O., & Cabrera, J. (2014). Florística de algunas plantas medicinales. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31, 165-168.

Sánchez, C., Gupta, M., & Santana, A. I. (2002). Actividad inmunomoduladora de las plantas (I). *Revista de Fitoterapia*, 2(2), 151.

Sandoval, M., Okuhama, N. N., Angeles, F. M., Melchor, V. V., Condezo, L. A., Lao, J., & Miller, M. J. (2002). Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry*, 79(2), 207-213.

Segal, A. W., & Peters, T. J. (1975). The Nylon Column Dye Test: A Possible Screening Test of Phagocyte Function. *Clinical Science and Molecular Medicine*, 49, 591-596.

Shimabuku Vega, N. F. (2017). Composición química de *Lepidium meyenii* Walp.(maca): comparando procedencias y colores del órgano de reserva. Disponible en http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1375/Composicion_ShimabukuVega_Naomi.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Sifuentes-Penagos, G., León-Vásquez, S., & Paucar-Menacho, L. M. (2015). Estudio de la Maca (*Lepidium meyenii* Walp.): cultivo andino con propiedades terapéuticas. *Scientia Agropecuaria*, 6(2), 131-140.

Stojanovska, L., Law, C., Lai, B., Chung, T., Nelson, K., Day, S., ... & Haines, C. (2015). Maca reduces blood pressure and depression, in a pilot study in postmenopausal women. *Climacteric*, 18(1), 69-78.

Stone, M., Ibarra, A., Roller, M., Zangara, A., & Stevenson, E. (2009). A pilot investigation into the effect of maca supplementation on physical activity and sexual desire in sportsmen. *Journal of ethnopharmacology*, 126(3), 574-576.

Takx-Köhlen, B. C. M. J. (1992). Immunomodulators. *Pharmaceutisch Weekblad*, 14(4), 245-252.

- Torres, D. (2008). Efecto modulador de la respuesta inmune humoral de extractos de *Lepidium peruvianum* Chacón (Maca) en ratones inmunosuprimidos con ciclosfosfamida (Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú).
- Tsai, J. T., Liu, H. C., & Chen, Y. H. (2010). Suppression of inflammatory mediators by cruciferous vegetable-derived indole-3-carbinol and phenylethyl isothiocyanate in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Mediators of inflammation*, 2010.
- Valencia, R. F. (2002). Factor de necrosis tumoral: Actividad biológica en neumopatías intersticiales. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 15(1), 48-53.
- Valdivia Cuya, M., Yarasca De La Vega, K., Lévano Sánchez, G., Vásquez Cavero, J., Temoche García, H., Torres Torres, L., & Cruz Ornetta, V. (2016). Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on testicular function of mice with chemically and physically induced subfertility. *Andrologia*, 48(8), 927-934.
- Valerio, L. G., & Gonzales, G. F. (2005). Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and maca (*Lepidium meyenii*). *Toxicological reviews*, 24(1), 11-35.
- Wadsworth, T. L., & Koop, D. R. (1999). Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical pharmacology*, 57(8), 941-949.
- Wang, W., Zou, Y., Li, Q., Mao, R., Shao, X., Jin, D., ... & Yang, L. (2016). Immunomodulatory effects of a polysaccharide purified from *Lepidium meyenii* Walp. on macrophages. *Process Biochemistry*, 51(4), 542-553.
- Wang, J., & Mazza, G. (2002). Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4183-4189.
- West, A. P., Koblansky, A. A., & Ghosh, S. (2006). Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 409-437.

Wright, A. E., & Douglas, S. R. (1903). An experimental investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis. *Proceedings of the Royal Society of London*, 72, 357-370.

Yllesca, G. M. (1994). Estudio químico fitoquímico comparativo de 3 ecotipos de *Lepidium meyenii* Walp “Maca” procedente de Carhuamayo (Junín). Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 103.

Young, H. A., & Hardy, K. J. (1995). Role of interferon- γ in immune cell regulation. *Journal of Leukocyte biology*, 58(4), 373-381.

Zhang, M., Wang, G., Lai, F., & Wu, H. (2016). Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Lepidium meyenii*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(9), 1921-1931.

Zhao, J., Avula, B., Chan, M., Clément, C., Kreuzer, M., & Khan, I. A. (2012). Metabolomic differentiation of maca (*Lepidium meyenii*) accessions cultivated under different conditions using NMR and chemometric analysis. *Planta medica*, 78(01), 90-101.

ANEXOS

ANEXO 1. Reactivos para la reacción de Peter Griess

Solución de NED

Alfa naftol.....0.05 g

Agua tridestilada c.s.p.....50 mL

Disolver el α -naftol y calentar a 60°C por una hora con movimiento constante

(Shaking). Almacenar a 4°C.

Solución de sulfanilamida

Ácido sulfanílico.....0.5 g

Solución de ácido fosfórico al 5%.....50 mL

Disolver el ácido sulfanílico y calentar a 60°C por una hora. Almacenar a 4°C.

ANEXO 2. Preparación de solución de MTT 5.5mg/mL

Metil tiazol tetrazolio.....27.5 mg

PBX 1X.....5 mL

Mezclar en *beaker* con barra magnética. Filtrar con membrana de 0.22 μ m. Alicuotar y almacenar a 4°C protegido de la luz hasta su uso.

ANEXO 3. Preparación de solución de NBT 5mg/mL

Nitroazul de tetrazolio.....25 mg

HBSS 1X.....5 mL

Mezclar en beaker con barra magnética. Filtrar con membrana de 0.22 μ m. Alicuotar y almacenar a -20°C protegido de la luz hasta su uso.

ANEXO 4. Preparación de reactivos para extracción de RNA (innuPREP RNA Mini Kit” de analytik-jena)

Buffer HS

Solución de lavado “HS”.....15mL

Etanol 99% grado molecular.....15mL

Buffer LS

Solución de lavado “LS”.....8mL

Etanol 99% grado molecular.....32mL

Homogenizar fuertemente ambas soluciones y almacenar a temperatura ambiente.

ANEXO 5. Reactivos para electroforesis

Preparación de gel de agarosa 1.5% en TAE

Agarosa químicamente pura.....0.75g

Buffer TAE 10X5mL

Agua bidestilada c.s.p.....50 mL

Preparación de gel de agarosa 1.7% en TBE

Agarosa químicamente pura.....0.85g

Buffer TBE 10X5mL

Agua bidestilada c.s.p.....50 mL

Calentar en microondas hasta su total disolución, teniendo cuidado de que no llegue a temperatura de ebullición.

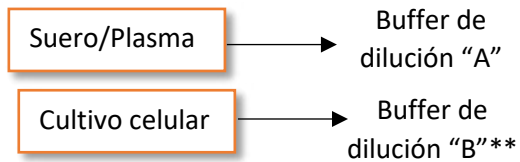
ANEXO 6. PRIMERS utilizados para PCR convencional

GEN	Tamaño amplicón (pb)	Secuencia
TNF- α	360	F 5'GTCAGATCATCTTCTCGAACC 3'
		R 5'CAGATAGATGGGCTCATACC 3'
GAPDH	218	F 5'TCCCTGAGCTGAACGGGAAG3'
		R 5'GCAGGAGTGGGTGTCGCTGT3

ANEXO 7. Preparación de reactivos para ELISA y curva estándar

A. Dilución de las muestras

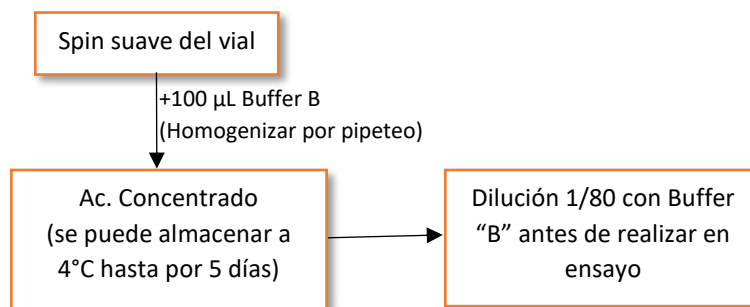
Diluir $\frac{1}{2}$ v/v *



*Se recomienda diluir la muestra $\frac{1}{2}$, sin embargo se deberá estandarizar la concentración óptima que depende finalmente de la cantidad de TNF- α presente.

**El Buffer "B" viene concentrado 5x, por ello será necesario llevarlo a la concentración de trabajo con agua desionizada.

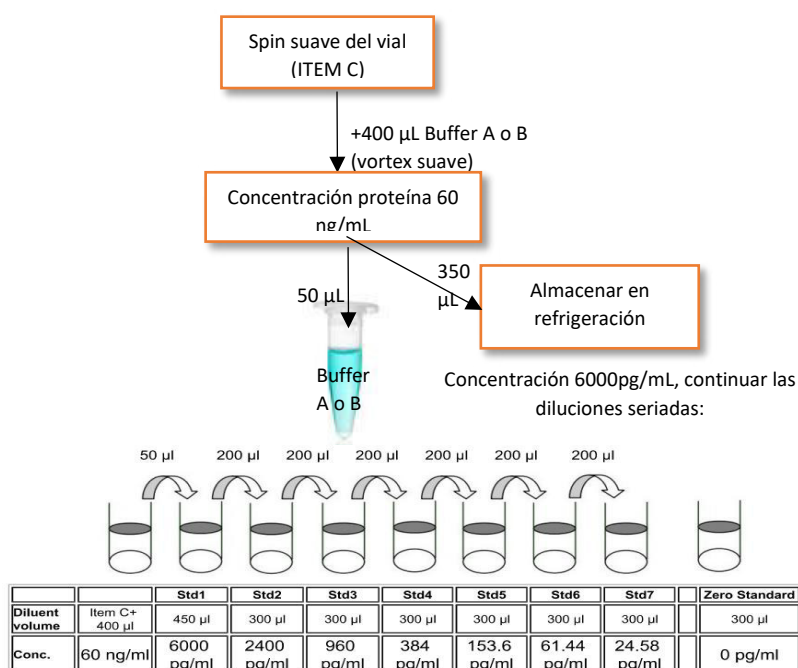
B. Preparación del Ac. Biotinilado de detección (ITEM F)



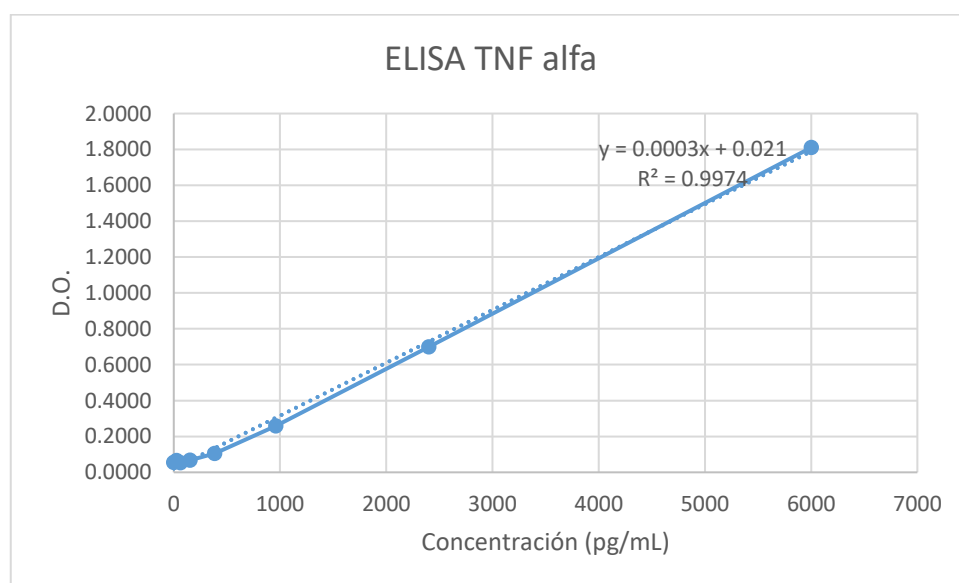
C. Dilución de HRP-Estreptavidina



D. Preparación del estándar



E. Curva estándar



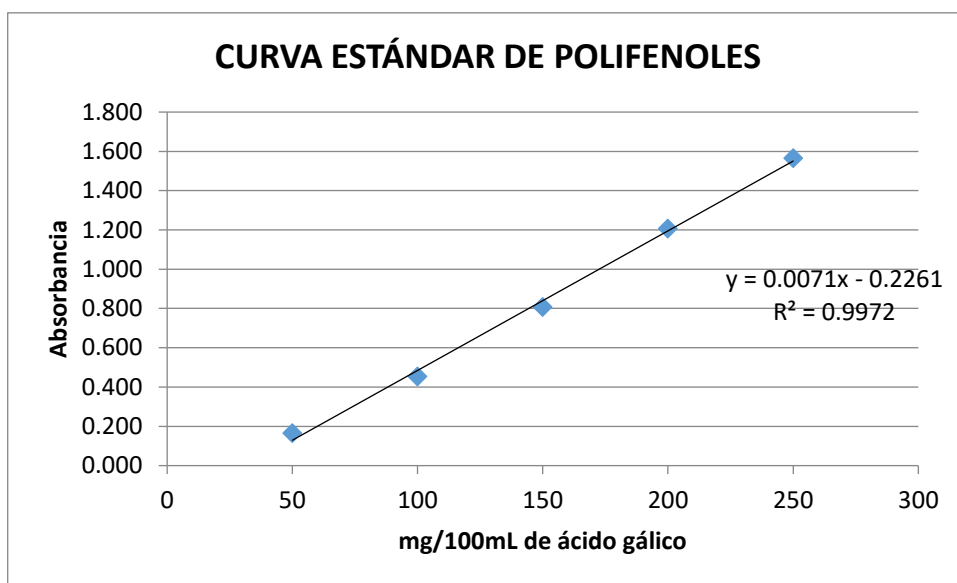
ANEXO 8. Preparación del medio RPMI-1640

RPMI-1640 con L-glutamina (Merck).....	100mL g
Solución de bicarbonato de sodio 7.5%.....	2.6 mL
Hepes 1M (10 mM).....	1 mL
Solución de antibióticos 100x	1 mL
Aminoácidos no esenciales (Sigma).....	1 mL

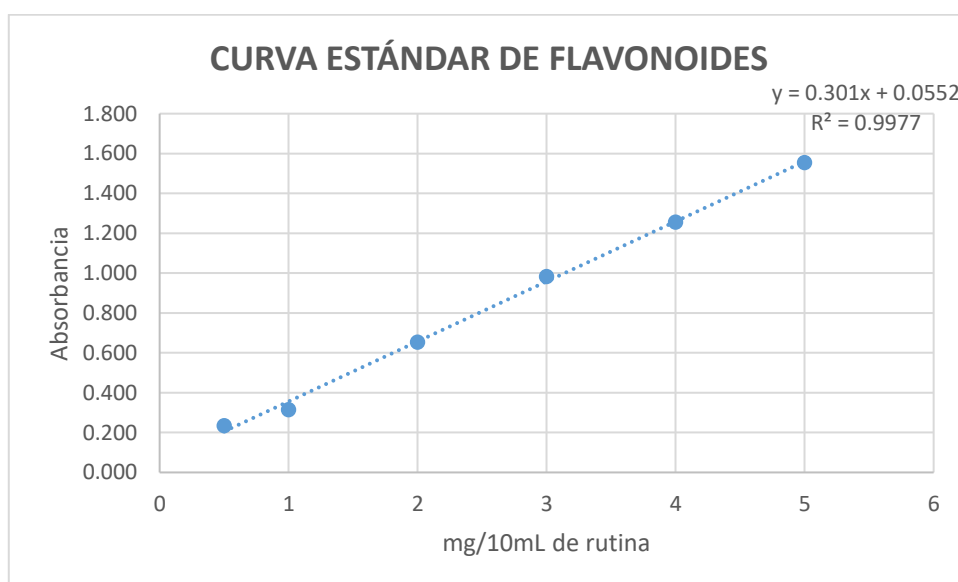
Homogenizar bien. Ajustar a pH 7.2-7.4 con ácido clorhídrico 1N. Agregar 10 mL de suero bovino fetal. Proteger de la luz y almacenar a 4 °C. Todos los insumos deben ser estériles.

ANEXO 9. Curvas estándar para cuantificación de metabolitos secundarios

A. Polifenoles



B. Flavonoides



ANEXO 10. Consentimiento informado

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Laboratorio de Inmunología

Yo, _____ con DNI N° _____ natural de _____ con domicilio en _____, distrito de _____, provincia y departamento de _____, declaro que he sido INFORMADO DETALLADAMENTE SOBRE los fines para los cuales estaré dejando una muestra sanguínea, en conformidad a la ley N° 29414, ley que establece los derechos de las personas usuarias de los servicios de salud.

Dicha muestra biológica será utilizada por el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para extracción de células inmunológicas, las mismas que serán sometidas a ensayos de inmunomodulación con extracto de *Lepidium meyenii* (maca). Dicha muestra será utilizada solo con fines de investigación, mas no de diagnóstico alguno.

Se me ha informado acerca de los posibles riesgos que pudiera ocasionar la venopunción venosa, además de la protección de mis datos personales. Finalmente, declaro que se me ha absuelto todas las dudas que he tenido acerca de la prueba y fines de la misma.

En muestra de conformidad, firmo a los _____ días del mes de _____ del año 20__.

Laboratorio de Inmunología

Nombre:
DNI: